

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

FARKLI KAYNAKLARDAN AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ İLE POLİFENOL OKSİDAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KİNETİK VE
ELEKTROFORETİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

123505

DOKTORA TEZİ

Mahmut ERZENGİN

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

123505

Balıkesir, Temmuz -2002

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

FARKLI KAYNAKLARDAN AFİNİTE
KROMATOĞRAFİSİ İLE POLİFENOL OKSİDAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KİNETİK VE
ELEKTROFORETİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Mahmut ERZENGİN

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Oktay ARSLAN

Sınav Tarihi : 23/07/2002

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Leman TARHAN

Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ

Doç. Dr. Oktay ARSLAN (Danışman)

Doç. Dr. Ümit ÇAKIR

Yrd. Doç. Dr. Yusuf FURAN

Balıkesir, Temmuz-2002

ÖZ

**FARKLI KAYNAKLARDAN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ İLE
POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI,
KİNETİK VE ELEKTROFORETİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Mahmut ERZENGİN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

(Doktora Tezi / Tez Danışmanı: Doç. Dr. Oktay ARSLAN)

Balıkesir, Temmuz- 2002

Bu çalışmada, enzimatik kararmaya neden olan polifenol oksidaz (PPO) enzimini saflaştırmak için yeni bir afinite jeli sentezlenmiştir. Afinite jeli, CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra ligand olarak PPO'nun inhibitörlerinden biri olan p-amino benzoik asitin L-tirozine kenetlenmesi sonucu sentezlenmiştir.

Enzim kaynağı olarak yer elması (*Helianthus tuberosus* L.) ve dut (*Morus alba* L.) meyveleri kullanılmıştır. Her iki kaynaktan izole edilen PPO enzimleri sentezlenen afinite jeli ile saflaştırılmıştır. Dut ve yer elması polifenol oksidaz enzimlerine nativ ve SDS poliakril amid jel elektroforezi uygulanarak, her iki enziminde yaklaşık 65 kDA molekül ağırlıklarına sahip olduğu bulunmuştur.

Katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak, yer elması ve dut PPO enzimlerinin aktiviteleri üzerine sıcaklık ve pH'nın etkisi araştırılmıştır. Yer elması PPO enziminin kullanılan üç farklı substratı için, optimum pH ve sıcaklıkları

sırasıyla pH 5.0-8.0 ve 20-35 °C arasında değiştiği bulunmuştur. Bu değerler dut PPO enzimi için ise pH 4.5-8.0 ve 20-45 °C arasında tespit edilmiştir.

Her iki kaynaktan izole edilen enzimin, çeşitli zaman aralıklarında, değişik sıcaklıklardaki ısı stabiliteleri araştırılmıştır. Sıcaklık artışının her iki enzim üzerinde denatürasyona sebep olduğu gözlenmiştir. Sıcaklığın dūřürölmesi sonucunda yalnız yer elması PPO enziminde renatürasyonun gerçekleştiği görölmüştür.

Dut ve yer elması PPO enzimlerinin optimum pH ve sıcaklıkta katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları için K_M ve V_{max} değerleri Linewear-Burk yöntemi ile bulunmuştur. V_{max}/K_M değerlerine göre yer elması PPO enzimi için en uygun substratın katekol, dut PPO enzimi için ise pirogallol olduğu bulunmuştur. Ayrıca, her iki enziminde p-kresol ve L-tirozin üzerinde hiçbir aktivite göstermediği saptanmıştır.

Dut ve yer elması PPO enzimleri üzerine PPO enziminin klasik inhibitörlerine ilaveten, ilk defa sülfanamid bileşikleride inhibitör olarak kullanılmıştır. Kullanılan bileşiklerin belirli oranlarda her iki enzimi de inhibe ettiği saptanmıştır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Yer elması; dut; polifenol oksidaz; afinite kromatografisi; ısı inaktivasyonu; inhibisyon; optimum pH ve sıcaklık.

ABSTRACT

PURIFICATION OF POLYPHENOL OXIDASE FROM DIFFERENT SOURCES BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY AND INVESTIGATION OF ITS KINETIC AND ELECTROPHORETIC PROPERTIES

Mahmut ERZENGIN

Balıkesir University, Institute of Science, Department of Chemistry

(Ph. D. Thesis / Supervisor: Doç.Dr. Oktay ARSLAN)

Balıkesir, July- 2002

In this study, a new affinity gel is synthesized for the purification of polyphenol oxidase (PPO) which leads to undesirable enzymatic browning in food industry. The affinity gel is prepared by coupling L-tirozin to Sepharose- 4B by CNBr activation method and than p-amino benzoic acid, which is one of the inhibitor of polyphenol oxidase, is coupled to L-tirozin as a ligand.

Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) and mulberry (*Morus alba* L.) fruits are used as enzyme sources. Polyphenol oxidases from jerusalem artichoke and mulberry were purified by affinity chromatography. The purified enzymes were migrated as a single band on native and SDS-PAGE. The molecular weight of the both purified enzymes were estimated to be 65 kDa.

Optimum PPO activity as a function of pH and temperature was determined using catechol, 4-methyl catechol and pyrogallol as substrates. The optimum pH and temperature values of jeruselam artichoke PPO for the used three substrates ranged

between the pH 5.0-8.0 and 20-35 °C. In the case of mulberry PPO, pH 4.5-8.0 and 20-45 °C values were obtained.

The thermal stability of the purified enzymes at different temperatures were tested for various period of time. At the end of the each incubation period the PPO activity was determined. Increasing of the temperature lead to considerable thermal denaturation of both PPO. After lowering of temperature, renaturation was observed only for PPO of jerusalem artichoke.

At the optimum pH and temperature, the K_M and V_{max} values of jerusalam artichoke and mulberry PPO towards catechol, 4-methylcatechol and pyrogallol were determined by Lineweaver Burk method. The values V_{max}/K_M showed that jerusalam artichoke has the greatest reactivity towards catechol and mulberry has the greatest reactivity towards pyrogallol among the substrates used. On the other hand, jerusalam artichoke and mulberry PPO showed no activity toward the monophenols, p-kresol and L-tyrosine, suggesting the absence of monophenolase (cresolase) activity.

Beside the classical PPO inhibitors, for the first time the inhibitory effect of some sulfanamid compounds on the jerusalam artichoke and mulberry PPO activities were also tested. Sulfanamid compounds exhibited considerable inhibition on both PPO enzymes.

KEY WORDS: Jerusalam artichoke; mulberry; polyphenol oxidase; affinity chromatography; heat inactivation; inhibition; optimum pH and temperature.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZ, ANAHTAR SÖZCÜKLER	i
ABSTRACT, KEY WORDS	iii
İÇİNDEKİLER	v
SEMBOL LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xx
ÖNSÖZ	xxix
1. GİRİŞ	1
1.1 Enzimatik Kararma	2
1.2 Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Biyokimyası	5
1.2.1 PPO'nun Adlandırılması	5
1.2.2 PPO'nun Tabiattaki Dağılımı	5
1.2.3 PPO'nun Katalizlediği Reaksiyolar	6
1.2.4 PPO'nun Substratları	7
1.2.5. PPO'nun Kresolaz ve Katekolaz Reaksiyon Mekanizmaları	11
1.2.6 PPO'nun Aktivatörleri	14
1.2.7 PPO'nun İnhibitörleri ve Enzimatik Kararmanın Önlenmesi	15
1.2.7.1 Enzime Birinci Derecede Etki Eden İnhibitörler	15
1.2.7.2 Reaksiyon Ürünleri veya Substratlar ile Reaksiyona Giren Bileşikler	18
1.3 PPO'nun Ekstraksiyonu, Saflaştırılması, Homojenliği ve Molekül Ağırlığı	19
1.3.1 Ekstraksiyon	19

1.3.2 PPO'nun Saflaştırılması	21
1.3.3 PPO'nun Homojenitesi ve Molekül Ağırlığı	25
1.3.4 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	26
1.3.5 PPO'nun Tabiattaki ve Gıda İşletmeciliğindeki Rolü	28
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	32
2.1 MATERYALLER	32
2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar	32
2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	33
2.2 YÖNTEMLER	38
2.2.1 Ham Ekstraktın Hazırlanması	38
2.2.2 Amonyum Sülfatla Çöktürme	38
2.2.3 Diyaliz	39
2.2.4 PPO Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması	39
2.2.4.1 Afinite Jelinin Hazırlanması	39
2.2.4.2 Enzim Çözeltilisinin Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu	41
2.2.5 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü	42
2.2.6 Protein tayini	44
2.2.6.1 Kalitatif Protein Tayini	44
2.2.6.2 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini	44
2.2.7 PPO Enziminin Aktivite Tayini	45
2.2.8 PPO Enzimi İle İlgili Kinetik Çalışmalar	45
2.2.8.1 Optimum pH ve Sıcaklık Çalışması	45
2.2.8.2 Aktivasyon Enerjisinin Hesaplanması	46
2.2.8.3 PPO'nun Sıcaklığa Bağımlı Denatürasyon ve Renatürasyon Özelliklerinin Araştırılması	46
2.2.8.4 Farklı Substratlar İçin Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	47
2.2.8.5 Farklı İnhibitörler İçin I_{50} Değerlerinin Bulunması	47
2.2.8.6 Farklı İnhibitörler İçin K_i Değerlerinin Bulunması	48
3. BULGULAR	52
3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	52

3.2 L-tirozinin Sepharose-4B'ye Bağlanma Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi	53
3.3 Yer Elması PPO (YPPO) Enzimi İle İlgili Çalışmaların Sonuçları	54
3.3.1 YPPO Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması	54
3.3.1.1 YPPO Enziminin 0.05 M Na ₂ HPO ₄ Tamponu (pH 5.0) İle Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması	54
3.3.1.2 YPPO Enziminin 0.05 M Na ₂ HPO ₄ Tamponu (pH 6.0) İle Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması	56
3.3.2 YPPO ve DPPO Enzimlerinin SDS Poliakrilamid ve Tabii Şartlarda Poliakrilamid Jel Elektroforezi	61
3.3.3 YPPO Enziminin Farklı Substratları için Optimum pH ve Sıcaklık Tayini	64
3.3.4 YPPO Enziminin pH'ya Bağımlı Aktivasyon Enerjisinin Değişimi	80
3.3.5 YPPO Enziminin Sıcaklığa Bağımlı Stabilite Özelliğinin Araştırılması	85
3.3.6 YPPO Enziminin Sıcaklığa Bağımlı Renatürasyon Özelliğinin Araştırılması	87
3.3.7 YPPO Enziminin Farklı Substratları İçin Optimum Şartlarda K _M ve V _{max} Değerlerinin Bulunması	89
3.3.8 YPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin I ₅₀ Değerlerinin Bulunması	95
3.3.9 YPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin K _i Değerlerinin ve İnhibisyon Türünün Bulunması	111
3.4 Dut PPO Enzimi (DPPO) İle İlgili Çalışmaların Sonuçları	118
3.4.1 DPPO Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması	118
3.4.1.1 DPPO Enziminin 0.05 M Na ₂ HPO ₄ Tamponu (pH 5.0) İle Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması	118
3.4.1.2 DPPO Enziminin 0.05 M Na ₂ HPO ₄ Tamponu (pH 6.0) İle Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması	120
3.4.2 DPPO Enziminin Farklı Substratları için Optimum pH ve Sıcaklık Tayini	125
3.4.3 DPPO Enziminin pH'ya Bağımlı Aktivasyon Enerjisinin Değişimi	141
3.4.4 DPPO Enziminin Sıcaklığa Bağımlı Stabilite Özelliğinin Araştırılması	146
3.4.5 DPPO Enziminin Sıcaklığa Bağımlı Renatürasyon Özelliğinin	148

Araştırılması	
3.4.6 DPPO Enziminin Farklı Substratları İçin Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması	150
3.4.7 DPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin I_{50} Değerlerinin Bulunması	155
3.4.8 DPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin K_i Sabitlerinin Bulunması	170
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	186
5. EKLER	201
EK A Sepharose-4B'nin IR spektrumu	202
EK B CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'nin IR spektrumu	203
EK C CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak L-tirozinin bağlanması ile oluşan yapının IR spektrumu	204
EK D L-tirozine p-aminobenzoik asidin bağlanması ile sentezlenen afinite jelinin IR spektrumu	205
6. KAYNAKLAR	206

SEMBOL LİSTESİ

Simge	Adı
PPO	Polifenol oksidaz enzimi
YPPO	Yer elması polifenol oksidaz enzimi
DPPO	Dut polifenol oksidaz enzimi
E.C.	Enzim kod numarası
U	Enzim ünitesi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
DVS	Divinil sulfon
TEMED	N,N,N', N',-tetrametiletilendiamin
OD	Optik dansite
IR	Infrared spektrofotometresi
I ₅₀	Yüzde elli inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu
PEG	Polietilen glikol
PVP	Polivinilpirolidon
PABA	p-aminobenzoik asit

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Melanin Pigmentlerinin Oluşum Mekanizması	3
Şekil 1.2	Vamos-Vigyazo tarafından önerilen PPO enzim katalizi	7
Şekil 1.3	PPO'nun kresolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması	12
Şekil 1.4	PPO'nun katekolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması	13
Şekil 2.1	Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları	41
Şekil 2.2	Kompetatif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği	49
Şekil 2.3	Nonkompetatif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği	50
Şekil 2.4	Unkompetatif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği	51
Şekil 3.1	Bradford yöntemine göre protein standart grafiği	52
Şekil 3.2	L-tirozinin aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye bağlanma süresini gösteren grafik	53
Şekil 3.3	Na ₂ HPO ₄ tamponu (pH 5.00) ile dengelenmiş afinite kolonunun yıkama çözeltilerindeki YPPO'nun absorban-aktivite grafiği	55
Şekil 3.4	Na ₂ HPO ₄ tamponu (pH 5.00) ile dengelenmiş afinite kolonundan saflaştırılan YPPO'nun absorban-aktivite grafiği	55
Şekil 3.5	Na ₂ HPO ₄ tamponu (pH 6.00) ile dengelenmiş afinite kolonunun yıkama çözeltilerindeki YPPO'nun absorban-	56

	aktivite grafiği	
Şekil 3.6	Na ₂ HPO ₄ tamponu (pH 6.00) ile dengelenmiş afinite kolonundan saflaştırılan YPPO'nun absorbans-aktivite grafiği	57
Şekil 3.7	Afinite kolonunun Na ₂ HPO ₄ tamponu (pH 5.00) ile yıkanması işleminden sonra YPPO enziminin 0.05 M Na ₂ HPO ₄ /1 M tamponu (pH 8.00) ile elusyonu	58
Şekil 3.8	Afinite kolonunun Na ₂ HPO ₄ tamponu (pH 6.00) ile yıkanması işleminden sonra YPPO enziminin 0.05 M Na ₂ HPO ₄ /1 M tamponu (pH 8.00) ile elusyonu	59
Şekil 3.9	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan YPPO ve DPPO enzimlerinin tabii şartlarda poliakrilamid jel elektroforezi	61
Şekil 3.10	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan YPPO enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezi	62
Şekil 3.11	Afinite kromatografisi ile saflaştırılan DPPO enziminin SDS poliakrilamid jel elektroforezi	63
Şekil 3.12	YPPO enziminin 20 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği	67
Şekil 3.13	YPPO enziminin 30 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği	67
Şekil 3.14	YPPO enziminin 35 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği	70
Şekil 3.15	YPPO enziminin 45 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği	70
Şekil 3.16	YPPO enziminin 55 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği	73

Şekil 3.17	YPPO enziminin 65 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği	73
Şekil 3.18	YPPO enziminin 75 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği	75
Şekil 3.19	YPPO enziminin üç farklı substratı için değişik sıcaklıklardaki optimum pH değişimini gösteren grafik	76
Şekil 3.20	YPPO enziminin katekol substratı için değişik sıcaklıklarda pH'ya bağlı aktivite değişimini gösteren grafik	77
Şekil 3.21	YPPO enziminin 4-metil katekol substratı için değişik sıcaklıklarda pH'ya bağlı aktivite değişimini gösteren grafik	78
Şekil 3.22	YPPO enziminin pirogallol substratı için değişik sıcaklıklarda pH'ya bağlı aktivite değişimini gösteren grafik	79
Şekil 3.23	YPPO enzimi için 10 mM katekol substratı ile pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği	80
Şekil 3.24	YPPO enzimi için 10 mM katekol substratı ile pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği	81
Şekil 3.25	YPPO enzimi için 10 mM 4-metil katekol substratı ile pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği	81
Şekil 3.26	YPPO enzimi için 10 mM 4-metil katekol substratı ile pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği	82
Şekil 3.27	YPPO enzimi için 10 mM pirogallol substratı ile pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği	82

Şekil 3.28	YPPO enzimi için 10 mM pirogallol substratı ile pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği	83
Şekil 3.29	YPPO enziminin inkübasyon süresine bağımlı koruduğu aktivite değişimi	87
Şekil 3.30	YPPO enziminin sıcaklığının çalışılan sıcaklıktan 22 C'ye düşürülmesi üzerine, 10 mM katekol substratı kullanarak, elde edilen inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiği	89
Şekil 3.31	YPPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği	93
Şekil 3.32	YPPO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği	93
Şekil 3.33	YPPO enzimi için pirogallol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği	94
Şekil 3.34	YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda sodyum azid için % aktivite-[I] grafiği	97
Şekil 3.35	YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda ditiyoeritritol için % aktivite-[I] grafiği	97
Şekil 3.36	YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda 4-karboksi benzen sülfamid için % aktivite-[I] grafiği	99
Şekil 3.37	YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda 2,4 dikloro-5-sülfamoil benzoik asit için % aktivite-[I] grafiği	99
Şekil 3.38	YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda sülfamid için % aktivite-[I] grafiği	101
Şekil 3.39	YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı	101

	konsantrasyonunda p- aminobenzoik asit için % aktivite-[I] grafiği	
Şekil 3.40	YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda L-sistein için % aktivite-[I] grafiği	103
Şekil 3.41	YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda sulfosalisilik için % aktivite-[I] grafiği	103
Şekil 3.42	YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda NaEDTA için % aktivite-[I] grafiği	105
Şekil 3.43	YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda etilen glikol için % aktivite-[I] grafiği	105
Şekil 3.44	YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda glutatyon için % aktivite-[I] grafiği	107
Şekil 3.45	YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda β -merkapt etanol için % aktivite-[I] grafiği	107
Şekil 3.46	YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda 2-merkapt benzotiazol için % aktivite-[I] grafiği	109
Şekil 3.47	YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda benzoik için % aktivite-[I] grafiği	109
Şekil 3.48	YPPO enzimi aktivitesi üzerine ditiyoeritritolün inhibisyon etkisi	114
Şekil 3.49	YPPO enzimi aktivitesi üzerine sulfosalisilik asidin inhibisyon etkisi	114

Şekil 3.50	YPPO enzimi aktivitesi üzerine sodyum azidin inhibisyon etkisi	117
Şekil 3.51	YPPO enzimi aktivitesi üzerine L-sistein'in inhibisyon etkisi	117
Şekil 3.52	Na ₂ HPO ₄ tamponu (pH 5.00) ile dengelenmiş afinite kolonunun yıkama çözeltilerindeki DPPO'nun absorbans-aktivite grafiği	119
Şekil 3.53	Na ₂ HPO ₄ tamponu (pH 5.00) ile dengelenmiş afinite kolonundan saflaştırılan DPPO'nun absorbans-aktivite grafiği	119
Şekil 3.54	Na ₂ HPO ₄ tamponu (pH 6.00) ile dengelenmiş afinite kolonunun yıkama çözeltilerindeki DPPO'nun absorbans-aktivite grafiği	120
Şekil 3.55	Na ₂ HPO ₄ tamponu (pH 6.00) ile dengelenmiş afinite kolonundan saflaştırılan DPPO'nun absorbans-aktivite grafiği	121
Şekil 3.56	Afinite kolonunun Na ₂ HPO ₄ tamponu (pH 5.00) ile yıkanması işleminden sonra DPPO enziminin 0.05 M Na ₂ HPO ₄ /1 M tamponu (pH 8.00) ile elusyonu	122
Şekil 3.57	Afinite kolonunun Na ₂ HPO ₄ tamponu (pH 6.00) ile yıkanması işleminden sonra dut PPO enziminin 0.05 M Na ₂ HPO ₄ /1 M tamponu (pH 8.00) ile elusyonu	123
Şekil 3.58	DPPO enziminin 20 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği	128
Şekil 3.59	DPPO enziminin 30 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği	128

Şekil 3.60	DPPO enziminin 35 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği	131
Şekil 3.61	DPPO enziminin 45 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği	131
Şekil 3.62	DPPO enziminin 55 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği	134
Şekil 3.63	DPPO enziminin 65 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği	134
Şekil 3.64	DPPO enziminin 75 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği	136
Şekil 3.65	DPPO enziminin üç farklı substratı için değişik sıcaklıklardaki optimum pH değişimini gösteren grafik	137
Şekil 3.66	DPPO enziminin katekol substratı için değişik sıcaklıklarda pH'ya bağlı aktivite değişimini gösteren grafik	138
Şekil 3.67	DPPO enziminin 4-metil katekol substratı için değişik sıcaklıklarda pH'ya bağlı aktivite değişimini gösteren grafik	139
Şekil 3.68	DPPO enziminin pirogallol substratı için değişik sıcaklıklarda pH'ya bağlı aktivite değişimini gösteren grafik	140
Şekil 3.69	DPPO enzimi için 10 mM katekol substratı ile pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5'da elde edilen logk – (1/T) grafiği	142
Şekil 3.70	DPPO enzimi için 10 mM katekol substratı ile pH 7.0, 7.5,	142

8.0, 8.5, 9.0 'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği

Şekil 3.71	DPPO enzimi için 10 mM 4-metil katekol substratı ile pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği	143
Şekil 3.72	DPPO enzimi için 10 mM 4-metil katekol substratı ile pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği	143
Şekil 3.73	DPPO enzimi için 10 mM pirogallol substratı ile pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği	144
Şekil 3.74	DPPO enzimi için 10 mM pirogallol substratı ile pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği	144
Şekil 3.75	DPPO enziminin inkübasyon süresine bağımlı koruduğu aktivite değişimi	148
Şekil 3.76	DPPO enziminin sıcaklığının çalışılan sıcaklıktan 22 C'ye dūřürölmesi üzerine, 10 mM katekol substratı kullanarak, elde edilen inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiği	150
Şekil 3.77	DPPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği	154
Şekil 3.78	DPPO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği	154
Şekil 3.79	DPPO enzimi için pirogallol substratı ile elde edilen Linewear-Burk grafiği	155
Şekil 3.80	DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda sodyum azid için % aktivite-[I] grafiği	158

Şekil 3.81	DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda ditiyoeritritol için % aktivite-[I] grafiği	158
Şekil 3.82	DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda p- aminometilbenzen sülfanamid için % aktivite-[I] grafiği	160
Şekil 3.83	DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda p-aminobenzoik asit için % aktivite-[I] grafiği	160
Şekil 3.84	DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda L-sistein için % aktivite-[I] grafiği	162
Şekil 3.85	DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda sulfosalisilik asit için % aktivite-[I] grafiği	162
Şekil 3.86	DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda NaEDTA için % aktivite-[I] grafiği	164
Şekil 3.87	DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda etilen glikol için % aktivite-[I] grafiği	164
Şekil 3.88	DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda glutatyon için % aktivite-[I] grafiği	166
Şekil 3.89	DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda β -merkaptto etanol için % aktivite-[I] grafiği	166
Şekil 3.90	DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda 2-merkaptto-benzotiazol için % aktivite-[I] grafiği	168

Şekil 3.91	DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda benzoik asit için % aktivite-[I] grafiği	168
Şekil 3.92	DPPO enzimi aktivitesi üzerine sodyum azidin inhibisyon etkisi	173
Şekil 3.93	DPPO enzimi aktivitesi üzerine ditiyoeritritolün inhibisyon etkisi	173
Şekil 3.94	DPPO enzimi aktivitesi üzerine p-aminometil benzen sülfanamidin inhibisyon etkisi	176
Şekil 3.95	DPPO enzimi aktivitesi üzerine p-aminobenzoik asidin inhibisyon etkisi	176
Şekil 3.96	DPPO enzimi aktivitesi üzerine L-sistein'in inhibisyon etkisi	179
Şekil 3.97	DPPO enzimi aktivitesi üzerine sulfosalisilik asidin inhibisyon etkisi	179
Şekil 3.98	DPPO enzimi aktivitesi üzerine glutatyonun inhibisyon etkisi	182
Şekil 3.99	DPPO enzimi aktivitesi üzerine β -merkapt etanol'ün inhibisyon etkisi	182
Şekil 3.100	DPPO enzimi aktivitesi üzerine 2-merkapt benzotiazol'ün inhibisyon etkisi	184
Şekil 4.1	YPPO ve DPPO'nun üç farklı substratına karşı V_{max}/K_M değerlerinin değişimini gösteren grafik	195

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 1.1	S.U.Pathak ve Arkadaşları Tarafından Hazırlanan Afinite Jelleri	24
Çizelge 2.1	İnhibisyon çalışmalarında kullanılan stok inhibitör çözeltilerinin hazırlanışı	35
Çizelge 2.2	SDS-PAGE Elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları	37
Çizelge 3.1	YPPO enziminin saflaştırılma tablosu	60
Çizelge 3.2	YPPO enzimi için 20 C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	65
Çizelge 3.3	YPPO enzimi için 30 C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	66
Çizelge 3.4	YPPO enzimi için 35 C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	68
Çizelge 3.5	YPPO enzimi için 45 C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	69

Çizelge 3.6	YPPO enzimi için 55 C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	71
Çizelge 3.7	YPPO enzimi için 65 C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	72
Çizelge 3.8	YPPO enzimi için 75 C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	74
Çizelge 3.9	YPPO enziminin üç ayrı substratı için değişik sıcaklıklardaki optimum pH değerleri	75
Çizelge 3.10	YPPO enziminin üç ayrı substratı için optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri	75
Çizelge 3.11	YPPO enzimi için değişik pH'larda üç farklı substratı için elde edilen aktivasyon enerjileri	84
Çizelge 3.12	YPPO enziminin denatürasyon çalışmasının sonuçları	86
Çizelge 3.13	YPPO enziminin renatürasyon çalışmasının sonuçları	88
Çizelge 3.14	YPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri , U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	90
Çizelge 3.15	YPPO enziminin, 4-metil katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	91

Çizelge 3.16	YPPO enziminin, pirogallol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	92
Çizelge 3.17	YPPO enziminin için üç farklı substratı için K_M ve V_{max} değerleri	94
Çizelge 3.18	YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sodyum azid ve ditiyoeritritolün, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	96
Çizelge 3.19	YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 4-karboksi benzen sülfamid ve 2,4 dikloro-5-sülfamoil benzoik asidin, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	98
Çizelge 3.20	YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sülfamid ve p-aminobenzoik asidin, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	100
Çizelge 3.21	YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-sistein ve sülfosalisilik asidin, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	102
Çizelge 3.22	YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren NaEDTA ve etilen glikolün, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör	104

	konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	
Çizelge 3.23	YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glutatyon ve β -merkaptto etanolün, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	106
Çizelge 3.24	YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 2-merkaptto-benzotiazol ve benzoik asidin, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	108
Çizelge 3.25	YPPO enzimi için 10 mM katekol substrat konsantrasyonunda % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları	110
Çizelge 3.26	YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ditiyoeritritol' ün katekol substratıyla K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	112
Çizelge 3.27	YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sulfosalisilik asidin, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	113
Çizelge 3. 28	YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sodyum azidin, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	115

Çizelge 3.29	YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-sistein'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	116
Çizelge 3.30	YPPO enziminin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri	118
Çizelge 3.31	DPPO enziminin saflaştırma tablosu	124
Çizelge 3.32	DPPO enzimi için 20 °C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	126
Çizelge 3.33	DPPO enzimi için 30 °C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	127
Çizelge 3.34	DPPO enzimi için 35 °C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans ,U, aktivite ve % aktivite değerleri	129
Çizelge 3.35	DPPO enzimi için 45 °C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	130
Çizelge 3.36	DPPO enzimi için 55 °C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	132
Çizelge 3.37	DPPO enzimi için 65 °C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans, U, aktivite ve % aktivite değerleri	133

Çizelge 3.38	DPPO enzimi için 75 C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorban, U, aktivite ve % aktivite değerleri	135
Çizelge 3.39	DPPO enziminin üç farklı substratı için değişik sıcaklıklardaki optimum pH değerleri	136
Çizelge 3.40	DPPO enziminin üç ayrı substratı için optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri	136
Çizelge 3.41	DPPO enzimi için değişik pH'larda üç farklı substratı için elde edilen aktivasyon enerjileri	145
Çizelge 3.42	DPPO enziminin denatürasyon çalışmasının sonuçları	147
Çizelge 3.43	DPPO enziminin renatürasyon çalışmasının sonuçları	149
Çizelge 3.44	DPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri , U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	151
Çizelge 3.45	DPPO enziminin, 4-metil katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	152
Çizelge 3.46	DPPO enziminin, pirogallol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri	153
Çizelge 3.47	DPPO enziminin üç farklı substratı için K_M ve V_{max} değerleri	155
Çizelge 3.48	DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sodyum azid ve ditiyoeritrolün, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	157

Çizelge 3.49	DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren p-amino metil benzen sülfan amid ve p-aminobenzoik asidin, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	159
Çizelge 3.50	DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-sistein ve sulfosalisilik asidin, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	161
Çizelge 3.51	DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren NaEDTA ve etilen glikolün, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	163
Çizelge 3.52	DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glutatyon ve β -merkapto etanolün, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	165
Çizelge 3.53	DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 2-merkapto benzotiazol ve benzoik asidin, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	167
Çizelge 3.54	DPPO enzimi için 10 mM katekol substrat konsantrasyonunda % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları	169
Çizelge 3.55	DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren	171

- sodyum azidin, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar
- Çizelge 3.56 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 172
ditiyoeritritolün, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar
- Çizelge 3.57 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren p- 174
amino metil benzen sülfanamid'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar
- Çizelge 3.58 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren p- 175
amino benzoik asidin, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar
- Çizelge 3.59 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L- 177
sistein'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar
- Çizelge 3.60 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 178
sulfosalisilik asidin, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

Çizelge 3.61	DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glutatyonun, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	180
Çizelge 3.62	DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren β -merkaptto etanolün, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	180
Çizelge 3.63	DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 2-merkaptto benzotiyazolün, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar	183
Çizelge 3.64	DPPO enziminin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri	185

ÖNSÖZ

Doktora çalışmalarımın her safhasında maddi ve manevi yardımlarını gördüğüm, insanlara yaklaşımını ve bilimsel yönünü kendime örnek aldığım çok kıymetli hocam sayın Doç. Dr. Oktay ARSLAN'a öncelikle en derin minnet ve şükranlarımı arz ederim.

Doktora tez izleme sınavları esnasında değerli bilgi ve yorumları ile bizleri yönlendiren çok kıymetli hocam sayın Prof.Dr. Leman TARHAN'a ve bölümümüz öğretim üyelerinden çok kıymetli hocam sayın Doç.Dr. Ümit ÇAKIR'a en derin saygılarımı sunarım.

Tezin yazılmasında emeği geçen Araş.Gör. Selma ÖZNUR, Araş.Gör. Serap DOĞAN, Araş.Gör. Özen ÖZENSOY ve Araş.Gör. Halil İbrahim UĞRAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca doktora çalışmalarımın esnasında bana hep destek olan eşim MÜCADELE ve kızım MERVE'ye sonsuz teşekkürlerimi belirtmek isterim.

Balıkesir, Temmuz- 2002

Mahmut ERZENGİN

1. GİRİŞ

Tüketicinin giderek daha bilinçlenmesi sonucu tüketilen besinlerin hem çevre ve insan sağlığına, hem de damak zevkine uygun olması talep edilmektedir. Bu nedenle gıda endüstrisi alanında, üretim ve pazarlama ile ilgili yeni yöntemler geliştirilmektedir [1]. Meyve ve sebzelerin depolanması esnasında ve çarpma, kesme, kabuk soyma, dilimleme gibi mekanik zedelenmeler sonucu bazı renk değişimleri ortaya çıkmaktadır. Pembeden, mavimsi-siyaha kadar olan farklı tondaki bu renk değişimlerine *kararma* denir. Bir çok meyve ve sebze ürünlerinde bu renk değişimleri bir dereceye kadar istenir, ancak çoğu kez istenilen seviyede durdurulamaz. Bu yüzden de gıda ürünlerinin tabii rengini bozarlar. Bu durum, ürünün sadece görünüş ve tadını bozmakla kalmayıp, onun besleyici değerini de düşürür.

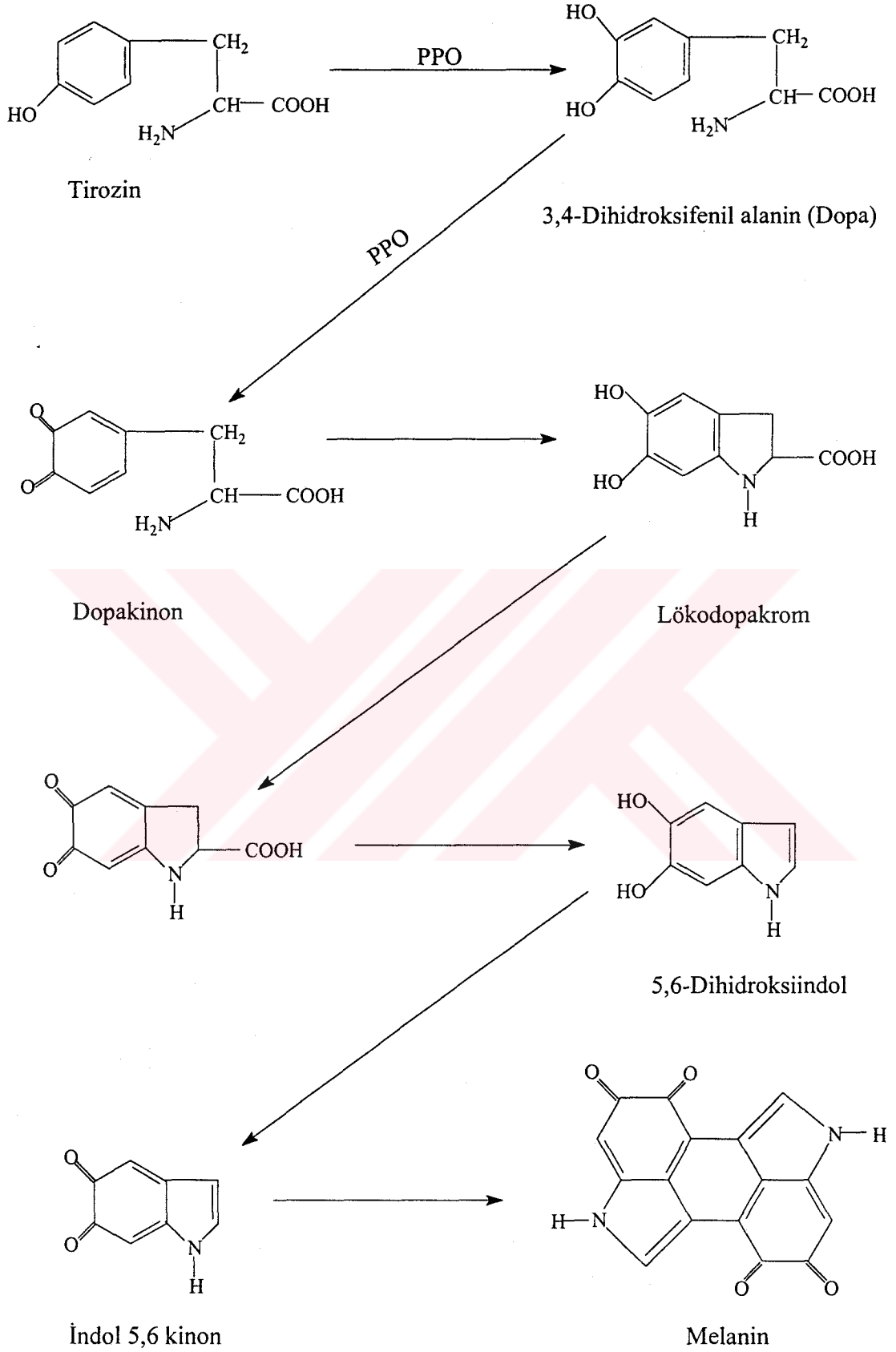
Polifenol oksidaz enzimi bir çok meyve ve sebze de bulunan ve bitkinin hastalıklara karşı direncinin artmasına neden olan bir metalo enzimdir. Gıda endüstrisindeki önemi ise, enzimatik kararmaya neden olmasından kaynaklanmaktadır. Kararmadan sorumlu tutulan polifenol oksidaz enzimi, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek, onları o-kinonlara yükseltger ve bunların polimerizasyonu sonucu esmerleşmeyi yapan kahverengi melanin pigmentlerinin oluşumuna yol açmaktadır [2]. Renk bozulmaları enzimatik ve/veya enzimatik olmayan kimyasal reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Enzimatik kararma için PPO, bunun etkilediği polifenolik substratlar ve oksijenin bir araya gelmeleri gerekir. Enzimatik kararma bu üç maddeden birinin ortadan kaldırılması ile durdurulabilir veya azaltılabilir. Meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında oksijenin varlığı kaçınılmazdır. Ayrıca bütün bitkilerin belirli oranlarda fenolik madde içerdiği bilinmektedir. Bu bileşikleri uzaklaştırmak kesinlikle pratik değildir. Enzimatik kararmanın önlenmesinde en geçerli yöntem PPO aktivitesinin kontrol edilmesidir. Bu nedenle enzim aktivitesine etki eden parametrelerin çok iyi bilinmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada yeni bir afinite jeli sentezlenerek ekonomik öneme sahip yer elması (*Helianthus tuberosus* L.) ve dut (*Morus alba* L.) meyvelerinden PPO enzimlerinin saflaştırılması planlanmıştır. Elde edilen saf PPO enzimlerinin kinetik ve elektroforetik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla aşağıdaki hedefler belirlenmiştir;

- Yeni bir afinite jelinin sentezi,
- Yer elması ve dut meyvelerinden bu afinite jeli ile PPO enzimlerinin saflaştırılması,
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve tabii şartlar altında poliakrilamid jel elektroforezi ile PPO enzimlerinin yaklaşık molekül ağırlıklarının tespit edilmesi,
- Çalışılan her bir substrat için optimum pH ve sıcaklıkların belirlenmesi,
- Belirlenen optimum şartlarda enzimin substratlarına olan ilgisinin araştırılması ve bu ilginin biyokimyasal ifadesi olan K_M ve V_{max} değerlerinin bulunması,
- Enzimin sıcaklığa bağımlı denatürasyon ve renatürasyon özelliklerinin araştırılması,
- Enzimin farklı inhibitörlere karşı ilgisinin araştırılması ve bu amaçla inhibisyon türünün tespiti ve K_i sabitlerinin ve I_{50} değerlerinin bulunması. Bu amaçla PPO'nun klasik inhibitörlerinin yanında, karbonik anhidraz enziminin spesifik inhibitörleri olan ve bir kısmı klinikte ilaç olarak kullanılan sülfanamidlerin PPO enzimi üzerine etkisi tarafımızdan ilk defa incelenmesi amaçlanmıştır.

1.1 Enzimatik Kararma

Meyve ve sebzelerin depolanması esnasında ve çarpma, kesme, kabuk soyma, dilimleme gibi mekanik zedelenmeler sonucu bazı renk değişimleri ortaya çıkmaktadır. Pembeden, mavimsi-siyaha kadar olan farklı tondaki bu renk değişimlerine *kararma* denir. Polifenol oksidaz enzimi, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek, onları o-kinonlara yükseltger ve bunların polimerizasyonu sonucu esmerleşmeyi yapan kahverengi melanin pigmentlerinin oluşumuna yol açmaktadır [2] (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Melanin Pigmentlerinin Oluşum Mekanizması

Meyve sularının ve dondurulmuş sebze ve meyvelerin endüstriyel amaçla hazırlanmaları sırasında ortaya çıkan bu tür reaksiyonlar kaliteyi düşürerek, ürünün pazar değerini de azaltır. Ayrıca karides, istakoz ve yengeç gibi kabuklu deniz hayvanlarının hazırlanmaları ve depo edilmeleri sırasında kabukta meydana gelen ezilmeler sonucu, polifenol oksidaz enziminin etkisiyle ortaya çıkan melanozis sonucu oluşan siyah renkli lekeler ürünün değerini düşürür [1]. Esmerleşme reaksiyonuna yol açan sebepler üç grup altında toplanmaktadır;

- Enzimlerin sebep olduğu esmerleşme reaksiyonları.
- Enzimatik olmayan oksidatif esmerleşmeler.
- Maillard reaksiyonu sonucu oluşan esmerleşmeler.

Bu reaksiyonlar içinde en yaygın olarak rastlanan enzimatik esmerleşme reaksiyonlarıdır. Enzimatik esmerleşme sebze, meyve ve tahıllarda doğal olarak bulunan polifenol oksidaz enziminin sebep olduğu bir oksidasyon reaksiyonudur. Normal şartlarda enzim hücre içerisinde oksijenden temassız bir halde bulunur. Fakat, meyve veya sebze kesildiği yada zedelendiği zaman enzim hücre dışına çıkarak moleküler oksijen varlığında bazı fenolik bileşiklerle reaksiyona girerek renkli bileşikler oluşturur [3-9].

Enzimatik kararmanın olabilmesi için polifenol oksidaz enzimi, bunun etkilediği fenolik madde ve moleküler oksijenin bir arada bulunmaları gerekir. Ayrıca sıcaklık ve pH gibi enzim aktivitesini direkt olarak etkileyen şartlarında uygun olması gerekir. Enzimatik esmerleşme; fenolik madde, moleküler oksijen ve polifenol oksidaz enziminden birinin ortadan kaldırılması ile durdurulur veya azaltılabilir. Ayrıca bu tür esmerleşme reaksiyonları ısı inaktivasyonu, substratların uzaklaştırılması, sodyum sülfid ve askorbik asit ilavesi, ortamın pH'sının düşürülmesi veya yüksek basınç uygulanması ile önlenbilir [1].

Enzimatik kararmanın ilk aşaması o-kinonların oluşmasıdır. o-kinonlar ise o-dihidroksifenol içeren her çeşit fenolik bileşenlerden oluşmaktadır. Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının substratı esas olarak o-dihidroksifenol grubu içeren bileşiklerdir. Ancak, bu her zaman zorunlu değildir. Nitekim bazı fenolik maddeler,

iki aşamada o-kinona okside olabilmektedirler. Birinci aşamada, monohidroksi fenollere hidroksil grupları bağlanarak o-dihidroksifenoller oluşmakta, ikinci aşamada ise bunlar o-kinonlara dönüşmektedirler.

Enzimatik kararım reaksiyonlarında oluşan ilk kilit madde olan o-kinonlar, renksiz bileşiklerdir ve bizzat herhangi bir renk bozunmasına neden olmazlar. Ancak oluşan o-kinon ve türevlerinden daha sonra dimerler oluşur ve nihayet bunlar daha büyük molekülü bileşiklere polimerize olurlar. İşte, renk bozulmalarının esas nedeni, esmer renkli olan bu polimerlerdir [10-11].

1.2 Polifenol Oksidaz (PPO) Enziminin Biyokimyası

1.2.1 PPO'nun Adlandırılması

Polifenol oksidaz (E.C.1.14.18.1) yapısında kofaktör olarak bakır içeren oksido redüktaz sınıfına ait bifonksiyonel bir enzimdir. Moleküler oksijen varlığında iki reaksiyonu katalizler; monofenollerin o-dihidroksi fenollere hidroksilasyonu (kresolaz aktivitesi) ve o-dihidroksi fenollerin o-kinonlara oksidasyonu (katekolaz aktivitesi) [2].

Enzimin sistematik adı; monofenol, L-dopa: oksijen oksido redüktaz şeklindedir. Bunun dışında enzimin katalizlediği substrata göre az kullanılan adları da vardır. Bunlardan bazıları , tirozinaz, kresolaz, fenolaz, monofenol oksidaz, difenol oksidaz, o-difenolaz, katekol oksidaz, pirokatekol oksidaz, dopa oksidaz, monofenol monooksidad, o-difenol oksido redüktaz, difenol oksidaz ve klorojenik oksidaz'dır [12].

1.2.2 PPO'nun Tabiattaki Dağılımı

PPO enzimi ilk olarak 1856 yılında Schoenbein tarafından yemeklik mantarlarda bulunmuştur [13]. Bundan sonra, bazı turuncgiller hariç, pek çok meyve ve sebze PPO enzimi belirlenmiş ve karakterize edilmiştir [2].

PPO doğada yaygın olarak bulunur. Bitkiler aleminde bulunmasının yanı sıra mikroorganizmalarda özellikle funguslarda, bazı hayvansal organlarda ve ayrıca kabuklu deniz hayvanlarında da bol olarak bulunan bir enzimdir. Buna ek olarak bazı toprak türlerinde glikoz oksidaz gibi oksido redüktaz enzimlerinin yanı sıra PPO enziminin varlığı ve aktivitesi bildirilmektedir [14-16]. Farklı bitkilerin PPO içeriği tür ve bitkinin yetiştiriliş biçimine göre değişmektedir. Bir çok sebze ve meyvenin içerisinde; zeytinlerin, özellikle katekol substratı üzerine, en yüksek PPO aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur [17]. Enzimin bitki hücrelerindeki lokalizasyonu bitkinin türüne, yaşına; meyve ve sebzelerde ise olgunluğa bağlıdır [18-31].

1.2.3 PPO'nun Katalizlediği Reaksiyonlar

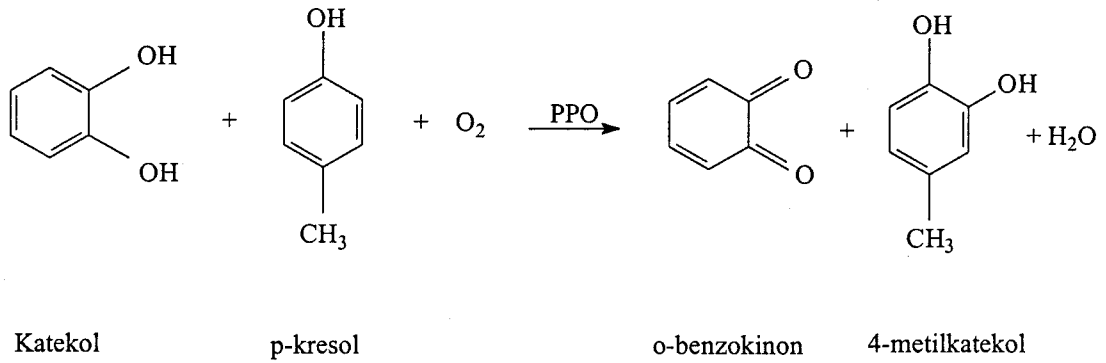
Pek çok bitkisel kaynaktan ve son zamanlarda mikroorganizmal kaynaktan PPO enzimi izole edilip saflaştırılmaya çalışılmış ve böylelikle yapısı ve reaksiyon mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. Kivi, marul, hurma, Anjou armudu, muz, Amasya elması, kakao tohumu, kuşburnu, yağ tohumu, yenilebilir dul avrat otu bu bitkisel kaynaklardandır. *Nurospora* ve *Agaricus* ise PPO izole edilen mikroorganizmalardandır [32]. Yapısında bakır içeren PPO enzimi moleküler oksijen varlığında birbirinden tamamen farklı iki reaksiyon katalizlemektedir;

- Monofenollerin hidroksilasyonu ile o-dihidroksi fenollerin oluşması (kresolaz aktivitesi).
- o-dihidroksi fenollerin o-kinonlara oksidasyonu (katekolaz aktivitesi) [30].

Farklı kaynaklardan elde edilen enzim ekstraktlarının her iki aktiviteye farklı oranlarda sahip olduğu bildirilmektedir [32]. Patates, elma, şeker pancarı yaprağı, bakla ve mantar gibi bir çok PPO ekstraktları her iki aktiviteye de sahip iken, çay yaprağı, tütün, hint kirazı, muz, armut ve kiraz PPO enzimlerinin mono hidroksi fenollere etki etmediği bildirilmektedir [23].

PPO enziminin kataliz reaksiyonu Vamos-Vigyazo tarafından aşağıdaki gibi verilmiştir (Şekil 1.2) [30]. Monofenollerin hidroksilasyonu sonucu oluşan

dihidroksi fenoller, yine PPO enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla o-kinonlara dönüştürülür. Oluşan kinon birimleri kendiliğinden birbirleriyle, protein ve indirgen şeker gibi bitki içerikleriyle kondense olarak kararmaya sebep olan yüksek molekül ağırlıklı polimerleri oluştururlar [23].

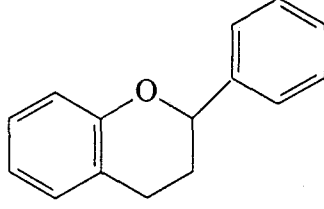


Şekil 1.2 Vamos-Vigyazo tarafından önerilen PPO enzim katalizi.

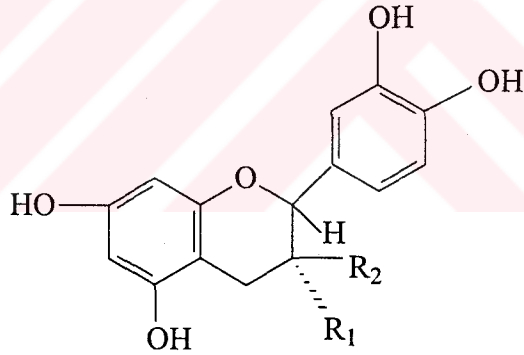
1.2.4 PPO'nun Substratları

Sebze ve meyveler çok çeşitli fenolik bileşikler içerirler. Ancak bu bileşiklerin çok az bir kısmı PPO enzimine substrat olabilmektedir. Polifenol bileşiklerinin enzim katalizli reaksiyonlar sonucu sebze ve meyvelerde renk bozulmalarına sebep olmalarının yanı sıra, meyvelerin tatlarına da etkileri vardır. Polifenol bileşikler, enzimatik olmayan reaksiyonlarla da renk bozulmalarına sebep olurlar. Bu bileşiklerden bazıları oldukça kolay bir şekilde kendiliğinden ootoksidasyona uğrarlar ve oluşan bileşikler polimerleşerek koyu renkli makro molekülleri oluştururlar [33-41].

PPO'nun meyve ve sebzelerdeki en önemli doğal substratları flavonoid tipi fenollerle, basit fenollerdir. Bunlardan bazıları katekinler, sinamik asit esterleri, 3,4 - dihidroksifenil alanin (DOPA), 3,4-dihidroksifenil etilamin (dopamin) ve tirozindir. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir [42].



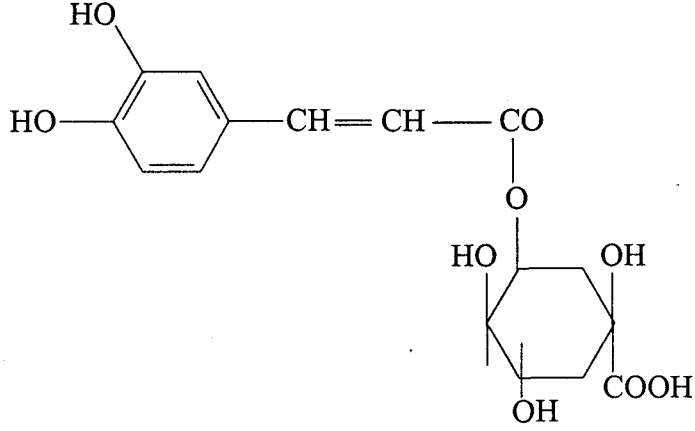
Katekinler flavonoidlerin 3-hidroksi türevleridir. Katekinler doğada (+)-katekin ve onun stereoizomeri olan (-)-epikatekin olarak bulunurlar. (+)-katekin ve (-)-epikatekinin seyreltik sodyum karbonat çözeltisinde ısıtılması ile katekin ve epikatekinlerin diastereoizomerlerinin rasemiği elde edilebilir. Katekinlerin kimyasal yapısı aşağıdaki gibidir.



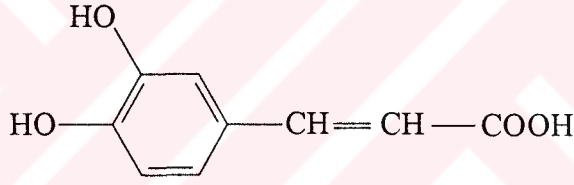
(+) - Katekin (R₁= H, R₂= OH)

(-) - Epikatekin (R₁= OH, R₂= H)

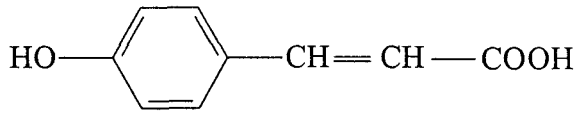
PPO'nun en yaygın doğal substratı sinamik asit esterlerinden klorogenik asittir. Klorogenik asidin yapısı aşağıdaki gibidir.



Klorogenik asidin kafeik asit (3,4-dihidroksi sinamik asit) kısmının p-kumarik asidin (4-hidroksi sinamik asit) PPO tarafından hidroksilasyonu ile oluşturduğu bildirilmektedir [43].



Kafeik asit
(3,4- dihidroksi sinamik asit)

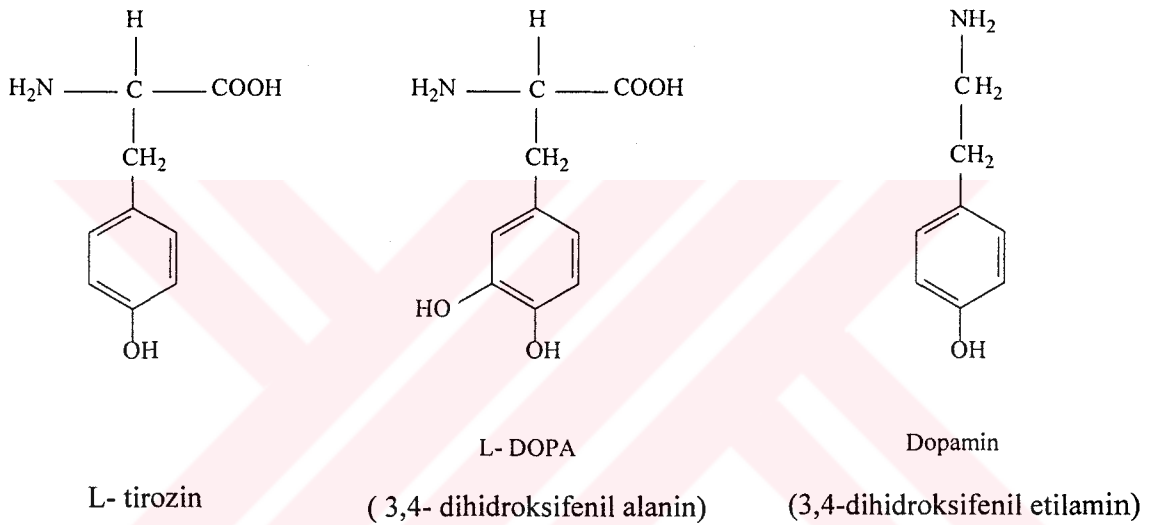


p- kumarik asit
(4- hidroksi sinamik asit)

Klorogenik asidin doğada bulunan izo-klorogenik asit, neoklorogenik asit, pseudoklorogenik asit ve “ Band 510 ” izomerleri de PPO'nun substratlarıdır [44].

Her bitkide bulunan tirozin aynı zamanda proteinlerin yapısını oluşturan amino asitlerden biridir. Dopamin (3,4-dihidroksifenil etil amin) ve tirozinin PPO ile hidroksilasyon sonucu oluşan L-DOPA (3,4-dihidroksifenil alanin) bitki dokularında mevcuttur.

Elma gibi bazı kaynaklardan elde edilen PPO, L-DOPA'yı dehidrogenasyona uğratmasına rağmen, tirozine karşı aktivite göstermez, fakat p-kresolu hidroksiller [45].



Doğal fenolik substratların her birinin sebze ve meyvede sebep oldukları enzimatik kararmaya katkıları fenollerin konsantrasyonuna ve lokalizasyonuna bağlı olduğu kadar, farklı kinonlardan elde edilen makro moleküler pigmentlerin renk şiddetine de bağlıdır. Bazı meyve ve sebzelerde PPO'nun ana substratı bitki materyallerinde genelde bulunmayan fenolik bileşiklerdir [46-57].

Şeker pancarı PPO enzimi, tirozine karşı aktivite göstermezken L-DOPA'yı dehidrogenasyona uğratmaktadır. Fakat ilginç olan şudur ki şeker pancarı dokularında kayda değer miktarda L-DOPA bulunmazken, oldukça fazla miktarda tirozin bulunmaktadır [46]. Bu da bazı araştırmacılar tarafından öne sürülen "PPO enziminin elde edildiği bitkilerde her zaman afinitesinin yüksek olduğu PPO substratları bulunmaz" tezini desteklemektedir [22,47].

Substrat spesifikliği yalnız meyve ve sebzenin cinsine bağlı değildir aynı zamanda belli bir ölçüye kadar enzimin meyve ve sebzenin ekstrakte edildiği kısmına ve yetiştirilişine bağlıdır. Aktivitenin araştırıldığı pH da substratın kullanılabilirliğini etkiler [58-59].

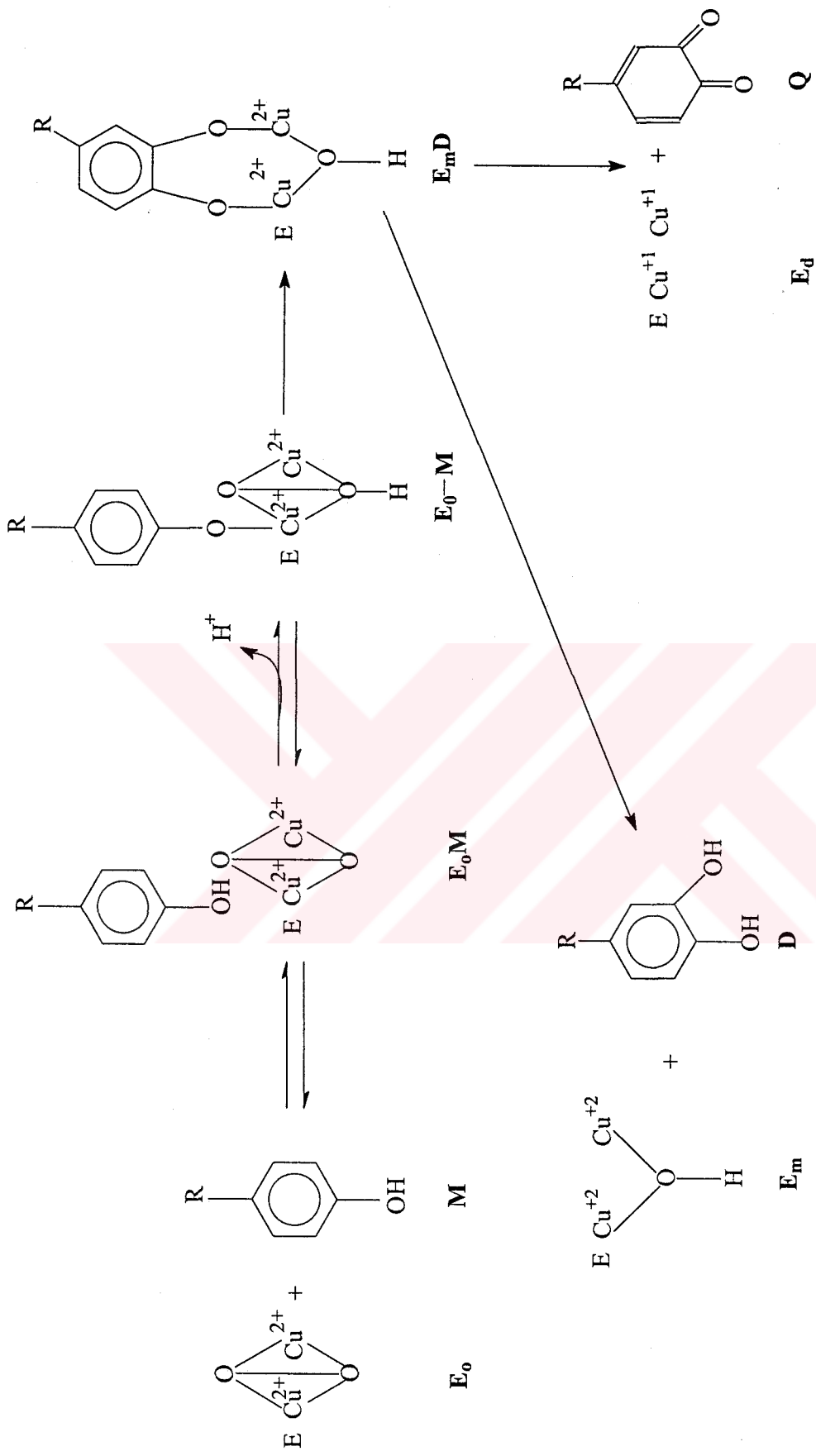
1.2.5. PPO'nun Kresolaz ve Katekolaz Reaksiyon Mekanizmaları

PPO'nun aktif bölgesi, iki bakır atomu içerir ve üç halde bulunur. Bunlar sırasıyla "met" (E_m), "deoksi" (E_d) ve "oksi" (E_o) halleridir [60-64]. E_m ; $Cu^{+2} - Cu^{+2}$ aktif bölgesi *met*polifenol oksidazdır. E_d ; $Cu^{+1} - Cu^{+1}$ aktif bölgesi PPO'nun indirgenmiş halidir. E_o ; $Cu^{+2} - O_2^{-2} - Cu^{+2}$ aktif bölgesi *oksi*polifenol oksidazdır.

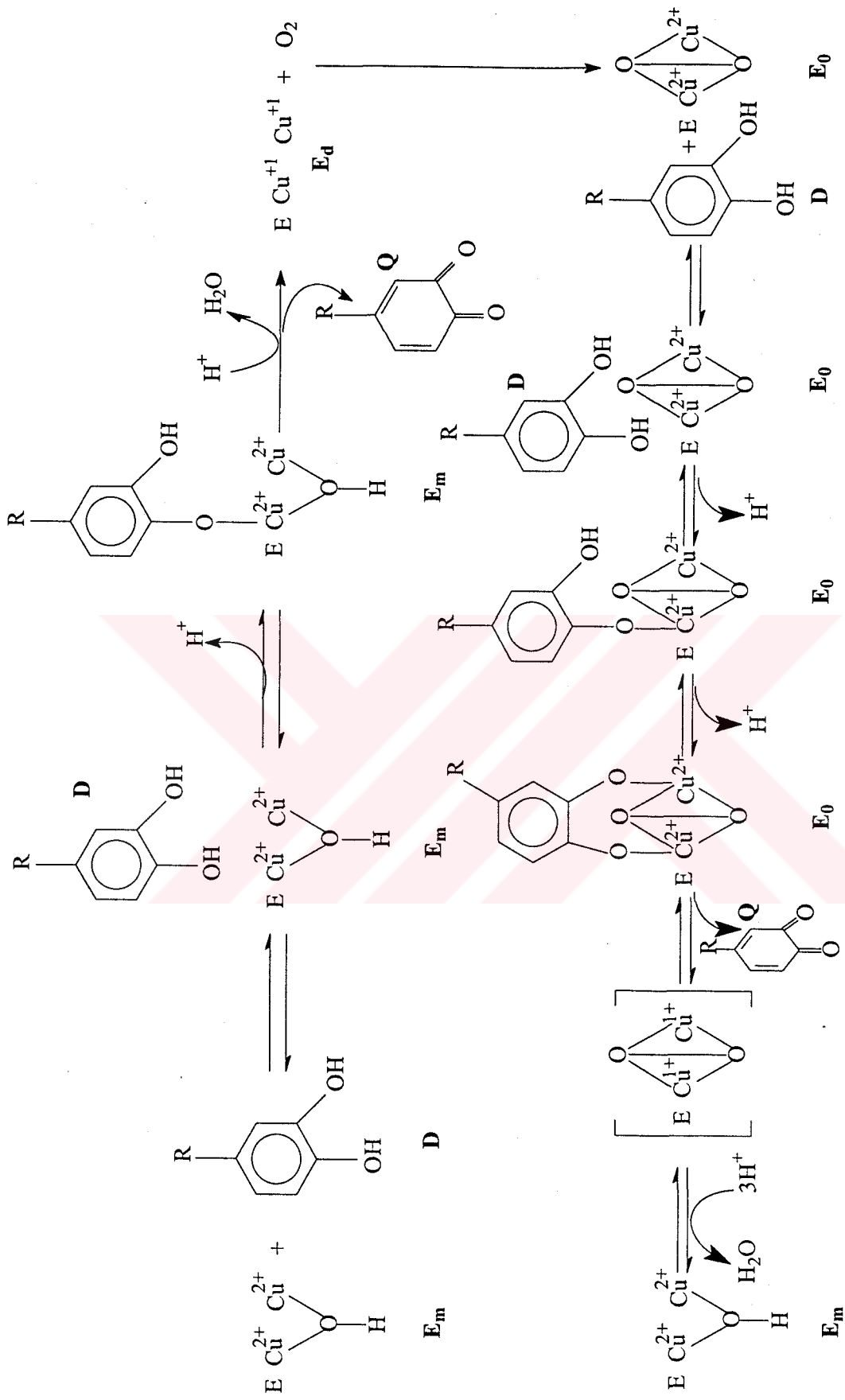
PPO'nun aktif bölgesindeki bakır atomlarının üç halde bulunması monofenollerin hidrosilasyonu ve oluşan o-dihidroksi fenollerin oksidasyonunu iğereren reaksiyon mekanizmaları için bir yapısal modele yol ağmıştır.

İlk olarak, monofenolik substrat, E_o 'ın aksiyal pozisyonundaki iki bakır atomundan birine koordine olur [65]. Üçgen bipiramid ara bileşiğindeki yeniden düzenleme; peroksit vasıtasıyla monofenolun hidrosilasyonuna su çıkışına ve E_mD kompleksinin oluşumuna yol açar [66-67]. Oluşan E_mD kompleksi ya $E_mD + 2H^+ \rightarrow E_m + D$ dengesini yerine getirerek katekolaz döngüsündeki ilk adım olan serbest difenolu verebilir yada aktif bölgeye bağlı difenolat ara bileşiği oksidasyona uğrayarak bir kinon ve bir indirgenmiş binükleer bakır enzim bölgesi (E_d) verir. E_d 'ye moleküler oksijen bağlandıktan sonra, *oksi* PPO(E_o) tekrar rejenere edilir.

PPO tarafından katalizlenen monofenollerin hidrosilasyonu ve o-dihidroksi fenollerin o-kinonlara oksidasyonu için Wilcox, Solomon ve arkadaşları tarafından önerilen reaksiyon mekanizmaları Şekil 1.3 ve 1.4'te verilmektedir [68].



Şekil 1.3 PPO'nun kresolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması.



Şekil 1.4 PPO'nun katekolaz aktivitesinin reaksiyon mekanizması.

1.2.6 PPO'nun Aktivatörleri

Enzimatik kararmanın önlenmesi ve PPO'nun inaktivasyonu üzerine çok fazla yayın varken, enzimin aktivasyonu üzerine yapılan çalışmalar çok azdır. Bu durum şüphesiz, çoğu zaman, enzimin aktivasyonunun arzu edilmemesinden kaynaklanmaktadır.

Elma kabuğundan hazırlanan mitokondrial enzim preparasyonu polivinilpirolidin (PVP) ile inaktive edildikten sonra, sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi anyonik deterjanlarla tekrar aktive edilmiştir [69]. SDS'nin farklı avacado türlerinden hazırlanan ham ve kısmen saflaştırılmış ekstraktlardaki inaktif PPO'yu da aktive ettiği bildirilmektedir [70]. Üzüm PPO'su kısa bir süre için üreye yada asidik pH'ya maruz bırakıldığında 4-10 kat arasında dönüşümlü olarak aktive olmaktadır. Bu durum, kloroplastlarda olduğu gibi kısmen saflaştırılmış enzim ekstraktlarında da görülmektedir. Üre inaktif bakla PPO'sunu aktive eder ve aynı zamanda enzimin monofenoller üzerine olan etkisinde artmaya sebep olur [71]. Ortama Cu^{+2} iyonlarının eklenmesi, turp PPO'sunun aktivitesini arttırırken, benzer muamelenin patates PPO'suna etkisi olmamaktadır [72-73]. L-DOPA, PPO tarafından katalizlenen adrenalinin oksidatif döngüsünü ve renkli ara bileşiklerin oluşumunu aktive eder. Tatlı patates dokularında substratların indüklediği aktivasyona da rastlanmıştır [74].

Farklı kaynaklardan elde edilen PPO'ların aktivasyonu sistematik olarak çalışmamasına ve belki de tam olarak anlaşılmasına rağmen, çalışılan birkaç örneğin büyük kısmı aktivasyon sırasında proteinlerin konformasyonel değişime uğradığını göstermektedir [30].

PPO'nun aktif formu bakır içeren bir enzim monomerinin bir oligomeri gibidir [75]. Aktivatörün rolü, enzimi biyolojik aktivitesiyle gerekli olan polimerizasyon reaksiyonunu gerçekleştirmesidir. Bu durum, substrat etkisi veya prostetik iyon eklenmesiyle daha iyi anlaşılabilir.

Enzim aktivitesi meyvelerde olgunlaşmayı hızlandıran gübrelerdeki eser elementler veya fiziksel muameleler gibi diğer faktörler ile de indüklenebilir [76]. Bu etki bitkideki enzim proteinin sentezinin artmasına, doğal bir inhibitörün eliminasyonuna (bu işlem inhibitörün bir metal iyonu ile kompleksleştirilmesi ile gerçekleştirilir), substratın yapısında veya hücre duvarının geçirgenliğindeki olası değişim ile ilişkilendirilebilir [77].

1.2.7 PPO'nun İnhibitörleri ve Enzimatik Kararmanın Önlenmesi

Enzimatik kararmanın sadece enzimin inaktivasyonu ile değil, aynı zamanda enzimatik reaksiyon için gerekli iki substrattan (O_2 ve fenolik bileşik) birinin uzaklaştırılması veya enzim etkisi sonucu oluşan ürünlerin bloke edilerek, enzimatik olmayan reaksiyonların sebep olduğu renkli bileşiklerin oluşumu engellenerek de önlenir. Bir çok durumda, bir inhibitörün etki mekanizmasını ayırt etmek kolay değildir; bazı durumlarda inhibitör enzime, substrata veya oluşan ürüne aynı zamanda etki edebilir.

Gıdaların işlenmesi esnasında kullanılan kararmanın inhibitörleri zehirlenme, sıhate, tada, kokuya ve ürünün bileşimine etkisi gibi bazı özel gereksinimlerden dolayı sınırlandırılmıştır. En iyi sonuçlar, etki mekanizmaları iyi anlaşılamayan genelde kimyasalların karışımı ile elde edilmektedir. Enzimatik kararmanın inhibitörleri aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir [78].

1.2.7.1 Enzime Birinci Derecede Etki Eden İnhibitörler

PPO, prostetik grup olarak bakır içeren bir metaloprotein olduğundan, siyanür, karbon monoksit, sodyum dietil ditiyo karbomat (DIECA), merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol, azid veya potasyum metil ksantat gibi metal şelatlayıcı reaktiflerle inhibe edilebilir [2].

Bu reaktiflerden bazıları, oluşan kinonlarla da reaksiyona girerler. Muz PPO'su üzerine DIECA'nın etkisiz olduğu bulunmuştur. Bu durum saflaştırılmış

enzimde bakırın bulunmayışı ile ilişkilendirilir [79]. Askorbik asit de enzimin prostetik grubunu şelatlayarak enzime direkt olarak etki edebilir.

İnhibitörlerin bu grubunun kloroplast, mitokondrial veya çözünmüş haldeki PPO üzerine etkileri farklı olarak bulunmuştur. Örneğin, mitokondrial ve çözünür formdaki PPO'nun katekolaz aktivitesi potasyum etil ksantat, DIECA ve tioüreye karşı benzer davranışlar gösterirken, kloroplastlarda aynı aktivite ksantat ile inhibe edilmez iken DIECA ile kısmen inhibe edilmiştir. Bu inhibitörlere, mitokondrial ve kloroplast fraksiyonlarının kresolaz aktivitesi benzer davranışlar göstermiştir fakat bu davranışlar katekolaz aktivitesinde gözlenen davranışlardan farklıdır.

Kresolaz aktivitesi üzerine DIECA'nın inhibisyon etkisi kafeik asit, katekol ve protokathik asit gibi o-dihidroksi fenollerin eklenmesi ile tamamen dönüşümlü hale getirilmiştir [80].

Florür ve azotür gibi inorganik iyonlar enzimi genellikle asidik ortamda inhibe ederler. Bakla PPO'su üzerinde florür yarışmasız inhibisyon etkisi gösterirken azotür karışık tip inhibisyon göstermektedir [81]. Borat gibi bazı inorganik iyonlar substratla kompleks yaparak inhibisyon etkisi gösterirler. Substrat olarak L-DOPA veya L-adrenalin kullanıldığında boratın yarışmalı inhibisyona sebep olduğu bulunmuştur [82].

Kiraz, elma, kayısı, şeftali ve patateslerden elde edilen enzimler üzerinde benzoik asit ve sinamik asidin bazı türevleri yarışmalı inhibisyon etkisi göstermektedir [83-85]. K_i değerleri; sinamik asit < p-kumarik asit < ferulik asit < m-kumarik asit < o-kumarik asit < benzoik asit şeklindedir. Bu bileşiklerin kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar, PPO enzim molekülü içinde substrat ve inhibitörün ayrı ayrı bağlandığı fakat birbirine yakın bölgelerin olduğunu göstermektedir [78,83]. Aromatik asit inhibitörleri, benzen halkası üzerinde konjuge pozisyonunda ya da halkaya direkt bağlı bir serbest karboksilik grubu içermelidirler. Düz zincirli asitlerin inhibisyon etkisi gösterebilmeleri için en az iki tane konjuge etilen grubuna sahip olmaları gerekir [49]. Metilasyon hem inhibisyonu hem de K_i değerini

düşürmektedir. İnhibitörün benzen halkasının metilasyonu ya da hidroksilasyonu katalitik bölgeye olan yarışı etkilediği sonucuna varılmıştır [49].

İnfekte olmuş elma dokularının açık rengi, yumuşak küf organizması *Penicillium expansum*'un oluşturduğu p-kumarik asit ve ferulik asit ile açıklanabilir [86].

Sinamik asit yapısındaki çeşitli inhibitörlerle yapılan çalışmalar inhibisyon türünün ve K_i değerinin hem inhibitörün ve hem de substratın yapısına bağlı olduğunu göstermektedir.

Klorogenik asit substrat olarak kullanıldığında, sinamik, p-kumarik, ferulik ve izo-ferulik asitleri elma dokusundaki hücre organellerine bağlı enzim üzerinde yarışmasız inhibisyona sebep olurken, çözünmüş formdaki enzimde ise yarışmalı inhibisyona neden olur. Çözündürme işlemi esnasında lipidlerin veya lipoproteinlerin uzaklaştırılması enzimin konformasyonel değişim kabiliyetini ve yapısal organizasyonunu modifiye ettiği sanılmaktadır [84].

Mantar PPO'sunun benzoik asit ile inhibisyonu substrat olarak katekol kullanıldığında yarışmalı inhibisyon, O_2 kullanıldığında ise yarışmasız inhibisyon olarak bulunurken aynı enzimin aynı substratlarla siyanid ile inhibisyonu ise sırasıyla yarışmasız ve yarışmalı inhibisyonlar vermiştir. Bu durum enzim molekülü üzerinde iki farklı substrat bağlama bölgesinin varlığı ile açıklanabilir. Bu bölgelerden birisi fenolik substratları içeren aromatik bileşikler için yüksek afiniteye sahip iken, diğer bölge ise oksijen ve metal bağlama fonksiyonlarından sorumlu bakır ihtiva eden kısımdır [86-87].

Verilen bir inhibitör için, aynı orijinli izoenzimlerin K_i değerleri farklı olabilir. Polivinilpirolidon (PVP) gibi çözünebilen polimerler PPO'nun yarışmalı inhibitörüdür [88-89]. İnhibisyon etkisi anyonik deterjanlarla ortadan kaldırılabilir. Şeker kamışı PPO'sunun güçlü bir inhibitörü olan tiyoglikolat hem enzim hem de substratlarla reaksiyona girer [91-94].

1.2.7.2 Reaksiyon Ürünleri veya Substratlar ile Reaksiyona Giren Bileşikler

Reaksiyon ürünleri veya substratlar ile reaksiyona giren enzimatik kararma inhibitörleri aşağıdaki gruplara ayrılabilir;

- *Oluşan kinonları, o-dihidroksi fenollere dönüştüren indirgeyici reaktifler:*

Bu reaktifler yüksek konsantrasyon da kullanılmadığı zaman inhibisyon esnasında tüketilir ve bundan dolayı renk değişimine karşı geçici bir koruma sağlarlar. İndirgeyici reaktifin yüksek konsantrasyonda, reaktif tüketilmeden önce reaksiyonun inaktivasyonu gerçekleşebilir. Bu indirgeyici reaktiflerden sıklıkla kullanılan bazıları şunlardır; askorbik asit, SO₂, potasyum metabisülfid, 2-merkaptetanol, 2-merkaptobenziyazol ve tiyoglikat'tır [95-104].

- *Kinon bağlayıcı reaktifler:*

Kinon bağlayıcı reaktifler kinonlarla renksiz kararlı bileşikler oluşturduklarından dolayı bu reaktifler tamamen tükenmediği müddetçe sürekli koruma sağlarlar. Sistein, glutatyon, benzen sülfirik asit, DIECA ve Na-etil ksantat bu tip reaksiyonları gerçekleştiren maddelerden bazılarıdır [105-111]. Yüksek moleküler ağırlığa sahip, suda çözünmeyen PVP fenolik bileşikleri kuvvetlice bağlar. Bazı enzimler metilasyon ya da benzen halkasının oksidatif parçalanmasıyla PPO'nun substratlarının yapısını bozarlar. O-metil transferaz enzimi 3,4-dihidroksi aromatik bileşiklerin 3-pozisyonunu metilleyerek PPO'nun substratlarını inhibitörlerine dönüştürür. Bu işlem için kofaktör olarak S-adenozilmetiyonine ihtiyaç duyulur. Kafeik asidin ferulik aside dönüştürülmesi bu işleme bir örnektir. Protokatekute-3,4-dioksigenaz enzimi de benzen halkasını parçalar fakat bitki PPO'sunun ana substratlarından biri olan klorogenik asit üzerine etkisi yavaştır. Meyvelerin ve sebzelerin bir çoğu nötral veya az asidik iken, bu her iki enzimde alkali pH'da aktiftir. Günümüzde bu inhibitör enzimlerinin kullanımına fazla ilgi gösterilmemektedir [2].

1.3 PPO'nun Ekstraksiyonu, Saflaştırılması, Homojenliği ve Molekül Ağırlığı

1.3.1 Ekstraksiyon

PPO'nun bitki materyallerinden ekstraksiyonu işleminde üç problemle karşılaşılır;

- Enzimin inaktif formda olması,
- Hücre organellerine bağlı enzimin çözünürleştirilmesi,
- Bitkilerde bulunan fenollerin enzim ile oksidasyonu sonucu polimerizasyonu ve enzim üzerine çökmesinin engellenmesi.

Bir çok bitki türünde PPO aktif formda bulunmaktadır, hücre organellerine bağlı inaktif enzim kafein-sodyum benzoat ile hem aktive hem de çözündürülebilirler [23]. Avocado'dan elde edilen ham ve kısmen saflaştırılmış preparasyonlardaki inaktif PPO sodyum dodesil sülfat (SDS) ile aktive edilebilir [112]. Çözündürme işlemi, genelde, Tween-80 veya Triton X-100 gibi deterjanlarla gerçekleştirilebilir [45,99]. Elma mitokondrial PPO'su için digitonin kullanılabilir iken, kloroplast PPO'su için Triton X-100'ün kullanımı iyi sonuçlar vermiştir [99]. Şeker kamışı yaprağı kloroplastlarından PPO'nun ekstraksiyonu sırasında ortama sodyum deoksikolatın eklenmesi aktiviteyi 4-4.5 kat arttırmaktadır [30]. Elma kabuklarından PPO'nun hazırlanması için, lipoproteinlere bağlı olabilen enzim proteinini almak için bütanol ekstraksiyonu tavsiye edilmektedir [45].

Çözünür bir PPO preparasyonu eldesin de üzerinden gelmesi gereken en büyük zorluk; bitki materyalinin ekstraksiyonu ve taşınması esnasında pigment oluşumunun ve enzimatik fenol oksidasyonunun engellenmesidir. Pigmentler enzim proteini üzerine çökebilirler ve enzimin çözünmemesine sebep olabilirler. Buna ek olarak, enzimin dönüşümsüz inaktivasyonuna sebep olabilirler. Bu tehlikeleri en az seviyeye indirmek için bütün ekstraksiyon adımları mümkün olduğu kadar düşük sıcaklıklarda yapılmalıdır. Taşıma ve homojenizasyon genelde sıvı azot veya azot atmosferinde yapılmaktadır. Bazı durumlarda materyalin ani dondurulması ve

dondurularak kurutulması enzim ekstraksiyon işleminde ilk basamak olarak tavsiye edilmektedir [45-46]. Aseton çöktürmesini takiben tampon ekstraksiyonu en çok kullanılan metotlardan birisidir [30]. Şeftalilerde aseton çöktürmesi ve ekstraksiyonun verimi karşılaştırıldığında, aseton çöktürmesi metodu aktivitede 20 kat daha fazla artışa sebep olmaktadır. Aktivitedeki bu son derece yüksek artış asetonun bir inhibitörü elimine etmesine ya da enzim proteinini aktif forma dönüştürmesi ile açıklanabilir [113].

Bazen uygun bir tamponla ekstraksiyon asetonla çöktürme adımının önüne geçer [27]. Ekstraksiyon için çeşitli tamponlar kullanılmaktadır ve pH değerleri enzim kaynağına bağlı olarak değişmektedir. Fakat pH genelde az bazik bir ortam sağlayacak şekilde ayarlanır. Tamponun pH'sı elde edilen enzimin yapısını etkileyebilir [30]. Ekstraksiyon sistemini enzimatik polifenol oksidasyonundan korumak için, ortama dönüşümlü enzim inhibitörleri katılabildiği gibi indirgeyici bileşikler ya da kinon bağlayıcıları da katılır. Askorbik asit, sistein, sodyum metabisülfid, DIECA ve sukroz veya bazende bu bileşiklerin karışımı kullanılmaktadır [78].

Enzim ekstraksiyonu sırasında fenol oksidasyonunun ve polimerizasyonun önlenmesinin en etkili bir yolu da ortamdaki substratların çözünmeyen bir polimere bağlanarak ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Fenol bağlama da en yaygın kullanılan madde polivinilpirolidon (PVP)'dir [114]. PVP, fenollerin iyonlaşmadığı nötral ya da asidik pH'da çok kuvvetli proton alıcısıdır. Aynı zamanda PVP, PPO'nun kısmi yarışmalı inhibitörüdür fakat PVP'nin inhibitör etkisi enzim preparasyonunun yıkanması ile elimine edilebilir. Fenollerin bağlanmasında bazen polietilen glikol (PEG) tercih edilir [114]. Belki de bunun sebebi ham enzim preparasyonu eldesinde, PEG'in asetondaki çözünürlüğünün belirli avantajlar sağlamasından dolayıdır [114]. Poliamid (nylon) ve polikaprolaktam fenol bağlamada başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [114]. Enzim dışındaki kazein gibi proteinler fenollerle hidrojen bağı kurmakta kullanılabilir. Proton alıcısı gibi davranan organik çözücüler (ketonlar, esterler, dimetil amid, dimetil sulfoksit ve N-metil pirolidin)'de fenollerle kompleks yapmada etkilidirler [114].

1.3.2 PPO'nun Saflaştırılması

Ham ekstrakt PPO preparasyonlarının saflaştırılması için, ulaşılmak istenen saflık derecesine ve enzim kaynağına göre değişen çok çeşitli metotlar tanımlanmıştır. Bu metotlardan sıklıkla uygulananları farklı doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi, Sephadex G-100 veya G-200 üzerinde jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE-Sephadex veya DEAE-selüloz anyon değiştiricileri üzerinde iyon değişim kromatografisidir. Buna ek olarak, düşük moleköl ağırlıklı safsızlıkları uzaklaştırmak için diyaliz ya da Sephadex G-25 kromatografisi bu metotların bazı kombinasyonlarının ara basamaklarında kullanılmaktadır [23]. Uygulanan metotların sırası değişebilir. Bazı durumlarda, bir ya da diğer saflaştırma basamağı tekrar kullanılabilir. Örneğin; mantar PPO'sunun saflaştırma prosedürü için iki amonyum sülfat çöktürme adımı bildirilmektedir, bunlardan birisi DEAE-selüloz kromatografisi öncesinde diğer i se sonrasında tatbik edilmiştir [43]. şeftali ve kiraz PPO'ları sırasıyla DEAE-selüloz ve DEAE-Sephadex kromatografisi ile saflaştırılmıştır [51]. Mantar PPO'suna, kalsiyum fosfat jeli üzerine adsorpsiyonu takiben hidroksiapatit üzerine adsorpsiyon kromatografisi uygulanmıştır [115]. şeftali PPO'sunun saflaştırılması için, hidroksiapatit kromatografisini takiben DEAE-selüloz kolonundan elusyon yapılmıştır [116].

Afinite kromatografisinin ve son zamanlarda da hidrofobik adsorpsiyon kromatografisinin biyolojik moleküllerin saflaştırılmasında ve izolasyonunda güçlü teknikler olduğu ispatlanmıştır. 1953 yılının başlarında Lerman, selüloza bağlanmış mantar PPO'sunun fenolik ve substitüe benzoik asit türevi inhibitörlerinin etkili bir afinite adsorbanları olabileceğini göstermiştir [117]. Daha sonra Gutteridge ve Robb, mantar PPO'sunun yarışmalı bir inhibitörü olan 4-amino benzoat'ı Sepharose-4B'ye bağlayarak, bu afinite adsorbantının enzimin saflaştırılmasında kullanışlı olduğunu göstermişlerdir [118]. Aynı dönemlerde O'Neill ve arkadaşları Sepharose-4B, aminofenol taşıyan camlar ve p-amino benzil selüloza fenolik, katekolik ve benzoil gruplarını bağlayarak hangi adsorbantın mantar PPO'suna spesifiklik gösterdiğini araştırmışlardır [119]. Bu adsorbantlardan, dopamin afinite kolonları ham ekstraktan enzimi alıkoymayı başarmıştır. Maalesef bu kolonlar kendiliğinden oksidasyona

uğradığından dolayı tekrar tekrar kullanılamamıştır. Benzer bir yaklaşım Yonekura ve arkadaşları tarafından at sineği tırtılı PPO enziminin saflaştırılması için kullanılmıştır [120]. Bu araştırmacılar afinite resini olarak fenilalanin, p-amino benzoat, bir p-amino benzoat türevi ve N-asetil-L-fenilalanini kullanmışlardır. Bunlardan sadece p-amino benzoat türevi, PPO'yu belirli bir derecede bağlamıştır. Menon ve Haberman ise Sepharosa 3-iodotirozini bağlamışlardır [121]. Bu taşıyıcı ile iki veya üç izoenzim formu ayrıştırılmış ve enzim kısmen saflaştırılmıştır.

Lerman yüksek tuz konsantrasyonunun nonspesifik adsorpsiyonu arttırdığını bildirmesine rağmen, bu çalışmalardan hiç birisi hidrofobik adsorpsiyon veya immuno afinite kromatografisinin kullanılması olasılığını araştırmamıştır. Bu teknik Flurkey ve Jen tarafından şeftali PPO'sunu saflaştırmada kullanılmıştır [122]. Flurkey ve Jen tarafından geliştirilen metot daha sonra Wissemann ve Lee [123], ve, Wissemann ve Montgomery [124] tarafından üzüm ve armut PPO'larının saflaştırılmasında adapte edilmiştir. Goldhirsh ve Whitaker haricinde mantar PPO'su veya ilgili enzimlerin immuno kromatografisi için küçük ilerlemeler bildirilmektedir [125]. Bu araştırmacılar mantar PPO'sunu izole etmek için immuno afinite kromatografisini kullanmışlardır. Kahn ve Andrawis mantar PPO'su üzerine tropolen, metimazol, L-mimozin, 2-merkaptobenzimidazol ve 2-merkaptobenzotiyazol'ün etkisini araştırmışlardır [126]. Bu inhibitörlerin bir çoğu düşük K_i veya I_{50} değerleri ile karakterize edilmiştir. Bunlardan bazıları da bakır şelatlayıcısı olarak bildirilmiştir. Mantar PPO'su için afinite resinleri p-aminobenzoik asit veya p-aminobenzoik asit türevleri olmasına rağmen, yukarıda bahsedilen inhibitörler daha kullanışlı ligandlar olabilir. Bu verilen bilgiler ışığı altında, Ingebrigtsen ve Flurkey bu inhibitörlerden herhangi birisinin düşük tuz (afinite) veya yüksek tuz (hidrofobik) şartları altında afinite adsorbantı olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırmışlardır [127]. Çeşitli alkil ve fenil türevlerinin de mantar PPO'su izolasyonunda afinite adsorbantı olarak uygulanabilirliği araştırılmıştır. Mantar PPO'su, solid desteklere bağlanmış 2-merkaptobenzimidazol, 2-merkaptobenzotiyazol, metimazol, mimozin ve tropolen ligandlarına karşı afinite ve hidrofik kromatografiye maruz bırakılmıştır. CNBr ile aktive edilmiş Sepharosa bağlanmış merkaptobenzimidazol, merkaptobenzotiyazol

ve metimazol kolonları ve epoksi ile aktive edilmiş Sepharosa bağlanmış mimozin kolonu afinite kromatografisi şartları altında enzimin önemli bir kısmını alıkoymuştur. Hidrofobik kromatografisi şartları altında yalnızca merkaptobenzimidazol ve merkaptobenzotiyazol kolonları enzimin önemli bir kısmını alıkoymuştur. Enzim, hidrofobik şartlar altında, fenil ve fenilbütülin kolonlarında da alıkonmuştur. Başlangıç tuz konsantrasyonu artırılması, hidrofobik şartlar altında çeşitli alkil kolonlarına bağlanan enzim miktarını arttırmaktadır. Mantar PPO'su iki antibadi kolonu üzerinde de adsorbe edilmiştir. Bir kolon holoenzimi alıkoyarken diğer kolon enzimle ilgili düşük molekül ağırlıklı proteinleri alıkoymuştur.

Bu sonuçlar, solid desteklere bağlanmış inhibitörler, fenolikler, alkil grupları ve antibadiler ile mantar PPO'sunun saflaştırılabileceğini ve karakterize edilebileceğini göstermektedir.

O'Neill ve arkadaşları CNBr ile aktive edilmiş Sepharose 4B'ye PPO'nun inhibitörlerinden olan p-aminobenzoik asidi bağlamışlardır [119]. Bu afinite matriksi üzerinde PPO'nun yüksek adsorpsiyonunu rapor etmişlerdir. Fakat PPO'yu saflaştıramamışlardır. Diğer taraftan Lerman, selüloza bağlı p-aminobenzoik asit ile hazırlanan afinite matriksi (Çizelge 1.10, matriks A) üzerinde PPO'nun düşük adsorpsiyonunu rapor etmiştir. O'Neill ve arkadaşları ve Lerman tarafından hazırlanan afinite matriksleri p-aminobenzoik asidin bağlanması metodu bakımından farklıdır. Bu durum, PPO'nun elüsyonu ve adsorpsiyonu üzerine aktivasyon prosedürünün etkisinin olabileceği görüşünü ortaya çıkarmıştır.

S.U.Pathak ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada afinite kromatografisi üzerine aktivasyon metotlarının etkisi araştırılmıştır [128]. Bu amaçla patates PPO'sunun afinite kromatografisinde kullanılmak üzere, CNBr veya divinilsulfon (DVS) ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye değişik uzantı kolları bağlanarak p-aminobenzoik asit (PABA)'inde bağlanmasıyla çeşitli afinite jelleri (B, C, D ve E) hazırlanmıştır (Çizelge 1.10)

Çizelge 1.1 S.U.Pathak ve Arkadaşları Tarafından Hazırlanan Afinitelendirilmiş Jel.

Jel	Aktivasyon Metodu	Afinitelendirilmiş Jel Yapısı
A	Esterifikasyon	
B	CNBr	
C	CNBr	
D	DVS	
E	DVS	

Selülozun aromatik eterlerine PABA'nın bağlanmasıyla hazırlanan afinite jeli (Çizelge 1.10, jel A) çok düşük PPO adsorpsiyonu gösterirken [117], CNBr ile aktive edilmiş Sepharose 4B'ye PABA'nın bağlanmasıyla oluşturulan afinite jelinin (Çizelge 1.10, jel B) PPO'yu adsorpsiyonu yüksektir. CNBr aktivasyonu ile hazırlanan B ve C jelleri, aktivasyon esnasında bazik amidine nitrojeninin katılımından dolayı pozitif bir yüke sahiptir. DVS aktivasyonu ile hazırlanan D ve E jelleri ise negatif yüke sahip grup içermektedir. CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye PABA'nın bağlanmasıyla hazırlanan B ve C jelleri PPO'ya karşı yüksek adsorpsiyon göstermiştir. pH'daki küçük değişiklikler elüsyonu etkilememiştir. Fakat 0.05 M sodyum fosfat tamponuna (pH 8.00) 1 M NaCl eklendikten sonra enzim elüe edilebilmiştir ve elüe edilen enzimin spesifik aktivitesi çok düşük bulunmuştur. Elüe edilen enzimin spesifik aktivitesinin düşük çıkmasının sebebi enzimin adsorpsiyon-elüsyon işlemi sırasında inaktive olmuş olabileceğine bağlanabilir. B ve C jellerin de kuvvetli bağlanma ve düşük elüat aktivitesi O'Neill'in bulgularıyla örtüşmektedir. C4 uzantı kolunun eklenmesi (Çizelge 1.10, jel C) elüsyon üzerinde hiçbir etkiye sebep olmamıştır. Bu da enzim ile matriks arasında hiçbir etkileşimin olmadığını göstermektedir. DVS ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye PABA'nın bağlanmasıyla oluşturulan afinite jelleri (Çizelge 1.10, jel D ve E) PPO'ya karşı düşük adsorpsiyon göstermişlerdir. Fakat adsorbe edilmiş enzim NaCl olmaksızın 0.05 M sodyum fosfat tamponu (pH 8.00) ile kolayca elüe edilmiştir ve elüe edilen enzimin spesifik aktivitesi yüksek bulunmuştur. Elüsyon yalnızca pH'daki değişimler ile etkilenmiştir. DVS ile aktivasyon matriks üzerindeki pozitif yükü de elimine etmiştir.

Hazırlanan bu jeller (Çizelge 1.10, B, C, D ve E) üzerinde PPO'nun bağlanmasındaki ve elüsyonundaki farklılıklar; CNBr ve DVS aktivasyonu ile matriksler üzerinde sağlanan yük farkına atfedilmektedir [128].

1.3.3 PPO'nun Homojenitesi ve Molekül Ağırlığı

Bir çok kaynaktan elde edilen PPO enziminin farklı moleküler yapılarda olduğu bildirilmektedir. Bu yapıların sayısı enzim kaynağına ve enzimin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında uygulanan metotlara bağlıdır. Molekül yapılarının farklı oluşu;

- benzer alt birimlerin değişik polimerizasyon derecelerinde birleşmelerine,
- farklı alt birimlerin değişik kombinasyonuna,
- tek bir proteinin konformasyonel değişimlerine, veya
- bahsedilen bu üç ihtimalin kombinasyonuna atfedilir [30].

Muz ve şeker kamışı kloroplastlarından elde edilen PPO'lar oldukça düşük moleköl kütlelerine (12000 ve 10000) sahip iken, genelde PPO monomerinin 30000 dalton civarında moleköl kütlesine sahip olduğu ve bir bakır atomu ihtiva ettiği kabul edilir [27].

Farklı moleköl yapıdaki enzimler substrat spesifikliği, optimum pH, optimum sıcaklık ve inhibitörlere karşı olan davranışları bakımından farklılıklar gösterebilirler. Dehidrogenasyon ve hidroksilasyon aktivitelerinin (katekolaz:kresolaz) oranları üzerinde çok detaylı çalışmalar vardır. Genel olarak, çeşitli yapıların yalnız bir kısmı monofenollere etki eder. Hidroksilasyon aktivitesinin dehidrogenasyon aktivitesine oranla daha kararsız olduğu alkali pH şartlarında, büyük moleköl ağırlıklı yapılar hidroksilasyon aktivitelerinin çoğunu kaybederler [46].

1.3.4 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

PPO aktivitesi substratın tükenme veya ürünün oluşum hızının ölçölmesiyle belirlenebilir. Enzimin reaksiyon inaktivasyonu kısa zamanda o-dihidroksi fenollerin oksidasyonunu yavaşlattığından dolayı her iki metotda da, reaksiyonun başlangıç hızının ölçölmesine dikkat edilmelidir.

Substratın tükenme hızı, genel olarak, O₂ absorpsiyonu ya Warburg respirometresi ile manometrik olarak ya da bir oksijen elektrodu ile polarografik olarak ölçölür. Bu iki metotda aynı sonuçları vermez. Aynı şartlar altında elde edilen O₂ absorpsiyon değerleri polarografik metotda daha yüksek çıkmaktadır [129].

Ürünün oluşum hızı kinonlardan oluşan renkli bileşiklerin optik dansitesinin ölçümüyle spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Bu metot oldukça basittir ve rutin analizlerde kullanılır.

Katekol, pirogallol veya klorogenik asit gibi doğal substratlar spektrofotometrik metotlarda kullanılabilir [130]. Çeşitli fenollerin oksidasyon ürünlerinden oluşan renkli bileşiklerin değişik dalga boylarında maksimum absorpsiyon vermeleri, özellikle alkali pH'larda substratların oto oksidasyona uğrayabileceği ve klorogenik asit gibi bazı inhibitörlerin fazla miktarlarının enzimin güçlü bir inhibisyonuna sebep olabileceği göz önünde tutulmalıdır [130].

Aktivite ölçümleri esnasında PPO'nun reaksiyon inaktivasyonunu geciktirmek için, çeşitli yöntemler kullanılır. Reaksiyon karışımı, enzim ve substratın yanı sıra, oluşan kinonları hemen indirgeyen hidrokinon ve askorbik asit gibi daha negatif indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bir veya daha fazla bileşik içerir. Bundan dolayı, bu reaktiflerin konsantrasyonları sabit kaldığı sürece, substratın katalitik miktarı yeterlidir. Sistemin indirgenme-yükseltgenme potansiyeli polarografik olarak ölçülebilir. Bu prensibe dayanan diğer uygulamalarda, reaksiyon karışımına kolay okside olabilen askorbik asit ilave edilir ve askorbik asidin maksimum absorpsiyon verdiği 265 nm'deki konsantrasyonundaki azalma ölçülür [131]. Askorbik asidin tükenme hızı enzim aktivitesi ile direkt olarak orantılıdır. Reaksiyon sistemindeki hızı belirleyen adım kinon \leftrightarrow substrat transformasyonudur. Askorbik asit oksidaz elde edilen sonuçlara tesir eder. Bu metodun diğer bir uygulamasına göre, reaksiyon ortamına eklenen belirli miktardaki askorbik asidin tamamının tükenmesi için gereken zaman yerine, renkli kinon ürünlerinin oluşumu ölçülür. Bu kronometrik metot olarak isimlendirilir.

Askorbik asit yerine 420 nm'de absorbans veren $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ kullanılabilir. Bu durumda, askorbik asidin mevcudiyeti veya 265 nm'de absorbans veren bitki materyalleri sonuca tesir etmez. Bu metodun diğer avantajları ise, ferrosiyanın özellikle asidik bölgelerdeki pH değişimlerine karşı askorbik aside göre daha az hassas olması ve çözeltide de daha kararlı olmasıdır. Aynı substrat

konsantrasyonu kullanıldığı zaman, ferrosiyanür metodu askorbik asit prosedürüne oranla yarı yarıya daha az hassastır [30].

Fenolik substratların ve reaksiyon ürünlerinin üzerine yapılan gaz kromatografisi çalışmaları, kolayca okside olabilen materyaller kullanılmadığında katekol substratı ile yüksek K_M değerlerinin elde edildiğini göstermiştir [132]. Bu çalışmalar, reaksiyonun Michaelis-Menten kinetiğine uyduğunu ve reaksiyon esnasında enzimin inaktivasyona uğradığını göstermiştir.

Reaksiyon inaktivasyonunu önlemek için çeşitli prosedürler tasarlanmıştır. Bu prosedürler reaksiyon karışımından kinonların uzaklaştırılmasına dayanır. 3-metil-2-benzotiyazolon hidrazon hidroklorik kinonlarla kondansasyon ürünleri oluşturur. Bu ürünler daha sonra kloroform ile reaksiyon karışımından ekstrakte edilir ve organik fazın absorpsiyonu 500 nm'de okunur. Kondansasyon ürünlerinin ekstraksiyonu yerine asetonda çözülmesi daha hassas sonuçlar vermektedir [133]. Diğer bir metotda ise her bir tiyol molekülü başına bir mol kinon tüketen ve renksiz bileşikler oluşturan sarı bir bileşik olan 2-nitro-5-tiyobenzoik asit anyonu kullanılır. Enzim aktivitesi 2-nitro-5-tiyobenzoik asidin 412 nm'deki absorbansındaki azalmasının spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle takip edilir [134].

1.3.5 PPO'nun Doğada ve Gıda İşletmeciliğindeki Rolü

PPO'nun bitkilerdeki mevcudiyeti sınırlı olmasına rağmen doğadaki rolü çok çeşitlidir. Yüksek bitkilerin solunum zincirinde görev alan terminal oksidazlardan biri olduğu bildirilmektedir fakat bu rolün önemi hala bir soru işaretidir [23].

PPO'nun tabiattaki en önemli görevi bitkilerin viral veya mikrobiyal enfeksiyonlara ve muhtemelen de değişik iklim şartlarına karşı direncinde rol oynamasıdır. PPO-polifenol sisteminin bitki patolojisindeki rolü hakkında çok çeşitli araştırmalar yapılmıştır.

Patates X virüsü ile enfekte olan dokular enzimatik kararmaya karşı daha hassastır ve bu dokular sağlıklı dokulara oranla daha fazla fenol içeriği bulundurur. Diğer taraftan, lipid içeriği enfekte olmuş dokularda daha düşüktür [135]. Tatlı patates dokularının *Ceratocystis fimbriata* mantarından elde edilen patojenik veya patojenik olmayan bir izolatla aşılması dokularda PPO aktivitesinin artışına neden olmaktadır. Tatlı patates köklerinin düşük konsantrasyonlardaki etilene maruz bırakılması da aynı şekilde *Ceratocystis fimbriata* enfeksiyonuna karşı direnci arttırdığı gibi PPO aktivitesini de arttırmaktadır [136].

Olgun elma dokularından ekstrakte edilen fenolik bileşikler *Botrytis cinera*, *Penicillium expansum* ve *Alternaria sp.*'nin çoğalmasını inhibe ettiği bulunmuştur. Olgunlaşma esnasında gözlenen fenolik içeriğin azalması, dokunun çürümeye maruz kaldığındaki artışla uyusmaktadır [137-139].

Bitkilerin enfeksiyona karşı olan dirençlerinde PPO'nun görevi basitçe şudur; enzim etkisi sonucu oluşan kinonlar, ikincil bir polimerizasyon reaksiyonları vererek su da çözünmeyen, koyu renkli polimerler oluştururlar. Bu polimerlerle doldurulan dokular enfeksiyonun yayılmasına karşı bariyer görevi üstlenirler. Bu olay bazı araştırmacılar tarafından PPO'nun ana fonksiyonu olarak kabul edilmektedir [30]. Lipid içeriğin azalması bu açıdan önemlidir. Çünkü, bu durum membranların geçirgenliğini etkileyebilir ve enzimin substratlarıyla temasını kolaylaştırarak "bariyerlerin" oluşumunu arttırabilir. Diğer bir teoriye göre de, polifenollerin oksidatif polimerizasyonunun ara ürünleri enzimi inaktive edebilir veya kararsız bitki enzimlerine ve virüslere bağlanır [30]. Zıt iklim koşullarına dirençli bitkilerde, genel olarak dirençsizlere oranla daha fazla PPO aktivitesine rastlanmıştır, örneğin kış şartlarına dayanıklı bir erik türü olan *Prunus ussuriensis* yapraklarında ve yine kış şartlarına dayanıklı asmalarda dayanıklı olmayanlara oranla daha fazla PPO aktivitesi bulunmuştur [140].

PPO'nun hidroksilasyon reaksiyonu tirozinin DOPA'ya, p-kumarik asidin kafeik aside, p-kumarilkuinik asidin klorogenik aside veya flavonoidlerin B-halkasına hidroksil grubunun katılmasıyla fenol biyosentezinde rol alır [78].

PPO'nun o-dihidroksifenoller üzerine etkisinden oluşan kinonlar triptofan ile reaksiyona girerek indolpirüvik asit üzerinden indol asetik asidi oluştururlar. Bundan dolayı, PPO bitki büyüme regülasyonunda rol alabilir [30].

PPO etkisiyle oluşan kinonlar humuslaşma ve enzimatik olmayan kararmaya yol açan benzer reaksiyonlara katılabilir ve bundan dolayı toprağın organik maddelerinin üretimine katkıda bulunur [15].

Gıda teknolojileri PPO enzimiyle ilgili olan enzimatik kararma olayı üzerinde yoğunlaşmışlardır. Enzimatik kararma PPO etkisinin dolaylı bir sonucudur. Enzim tarafından katalizlenen oksidatif reaksiyonun birincil ürünleri olan kinonlar; (a) birbirleriyle reaksiyona girerek yüksek molekül ağırlıklı polimerleri oluştururlar, (b) amino asitler veya proteinlerle makromoleküler kompleksler oluştururlar ve (c) düşük indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bileşikler okside ederler. Enzimatik olmayan (a) ve (b) reaksiyonları kahverengi pigmentlerin oluşumuna yol açar, bunların molekül ağırlığı yükseldikçe renk daha da koyulaşır, (c) türündeki reaksiyonların ürünleri renksizdir. Erik, sultani üzüm veya siyah çay üretiminde enzimatik kararma arzu edilen bir prosestir. Yeşil kahve çekirdeği PPO aktivitesi ve içeceğinin kalitesi arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur [30].

Fermente içeceklerin koku ve tadında PPO etkisi istenen bir durum olabilir. Elma suyu ve fermente armut suyu üretiminde, doğal olarak bulunan fenollerin polimerize ve kondense olmuş oksidasyon ürünleri çöker ve filtrasyonla uzaklaştırılır [78]. Üzüm fenollerinden, başlıca katekinler, enzim ile oluşturulan kinonlar amino asitlerle reaksiyona girebilir ve son ürün olarak uçucu aldehitleri verirler.

Meyve ve sebzelerin taşınması veya işlenmesi esnasında meydana gelen zedelenmelerden dolayı veya bu ürünlerin kesilmiş, dilimlenmiş yüzeylerinin havaya maruz bırakılması ya da dondurulduktan sonra çözünmesi enzimatik kararmaya yol açar. Bu durum, şüphesiz, oldukça istenmeyen bir işlemdir ve engellenmelidir.

Bazı un türlerinde bulunan yüksek PPO aktivitesi ekmek veya makarna ürünlerinde kararmayı meydana getirir. Enzimatik olarak oluşan kinonların kazein

gibi proteinlerle reaksiyonu makarna ürünlerinin sindirimini ve lizin içeriğini azaltır [141]. Bu besinlerin besleyici değerini etkileyebilir. Enzimatik renk değişimi, pancar ve şeker kamışının işlenmesi esnasında yalnız son ürünün rengine etki edebileceğinden değil aynı zamanda oluşan polimerlerin şekerin kristallizasyonunu zorlaştıracağından ve verimi düşüreceğinden dolayı da istenmeyen bir durumdur [46]. En istenmeyen durum ise (c) grubuna ait reaksiyonlar sonucu, PPO tarafından oluşturulan kinonların düşük indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bileşikler okside etmesidir ki bu bileşikler aynı zamanda dihidroksi fenollere indirgenmektedir. Bundan dolayı, bunlar (kinonlar) enzimin oksidatif etkisine taze substrat sağlamayı reaksiyon ürünleriyle inaktive oluncaya kadar veya düşük indirgenme-yükseltgenme potansiyeline sahip bileşikler tükeninceye kadar devam ederler. Bu olay askorbik asidin kinonlar üzerinde nasıl bir etki yaptığını ve bu bileşiğin renk değişimini nasıl önlediğinin sebeplerinden birini göstermektedir. Bunun tamamı tükeninceye kadar, kinonlar sürekli olarak indirgenir ve birbirleriyle veya dönüşümsüz renkli polimerler oluşturmak üzere proteinler veya amino asitlerle reaksiyon veremez. Bundan dolayı, enzimatik kararmanın oluşumu dokulardaki vitamin C'nin tamamının bittiğini gösterir. Patlıcan, vişne ve kirazda görüldüğü gibi antisiyaninler PPO tarafından oluşturulan kinonlar ile, benzer şekilde, bozundurulurlar. Askorbik asit antosiyanin oksidasyonu düşük indirgenme-yükseltgenme potansiyeli ile engeller [30].

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 MATERYALLER

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyisel çalışmalarda kullanılan, Sepharose-4B, p- aminobenzoik asit, L-tirozin, standart serum albümin, N,N,N,N' tetrametiletilediamin (TEMED), diyaliz torbaları Sigma Chemical Comp'den; trikloro asetik asit (TCA), sodyum hidroksit, sodyum klorür, sodyum karbonat, sodyum sitrat, trihidroksimetil aminometan (Tris), siyanojen bromür, amonyum sülfat, sodyum sülfat, sülfürik asit, glisin, fosforik asit, asetik asit, etil alkol, metil alkol, hidroklorik asit, sodyum azotür, sodyumnitrat, sodyumdihidrojen fosfat, sodyum bikarbonat, askorbik asit, polietilenglikol (PEG), katekol, 4-metil katekol, pirogallol, L-sistein, glutasyon, ditiyoeritritol, NaEDTA, β -merkaptobetanol, 2-merkaptobenzotiyazol, sülfosalisilik asit, p-kresol, etilen glikol, Merck A.G'den ; akrilamid, bisakrilamid, amonyum persülfat, SDS, bromfenol mavisi, gliserol, Coomassie brillant blue G-250, Coomassie brillant blue R-250 Fine Chemical'dan sağlandı.

2.1.2 Kullanılan Alet ve Cihazlar

Bu çalışmada aşağıdaki alet ve cihazlardan yararlanılmıştır.

Soğutmalı santrifüj	: Hettich zentrifugen, EBA-12R
pH metre	: Orion- model 920A
UV-Spektrofotometre	: CARY 1E, UV-Visible Spectrophotometer-VARIAN
Manyetik karıştırıcı	: IKA Combimag RCO
Peristaltik Pompa	: Pharmacia Fine Chemicals
Kronometre	: Hanhard, Elektronisch Digital Stoppuhr
Terazi	: Libror, AEG-220 (Shimadzu)

Otomatik pipetler	: Fischer
Homojenize Edici	: Ev tipi blender
Elektroforez tankı	: Hoefer, HSI
Kromatografi Kolonu	: Pharmacia Fine Chemicals
Derin dondurucu	: Sanio Medical Freezer
Etüv	: Elektromag
Çalkalayıcı	: Clifton
Sabit sıcaklık sirkülatörü	: Techne-Tempette Junior TE-8J
Vortex	: Fisons Whirli Mixer

2.1.3 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Deneyisel çalışmalarda kullanılmak üzere aşağıdaki çözeltiler hazırlandı.

1) Ekstraksiyon tamponu: % 0.5 PEG, 10 mM askorbik asit içeren 0.5 M fosfat tamponu (pH 7.3); 8.7 gr (0.05 mol) K_2HPO_4 , 0.5 gr polietilen glikol (PEG), 0.176 gr (0.001 mol) askorbik asit 80 mL saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 7.3'e kadar pH metre yardımıyla titre edildi ve son hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2) Amonyum sülfat çöktürmesi sonucunda oluşan çökeleğin çözeltiye alındığı ve diyaliz yapıldığı tampon: 5 mM fosfat tamponu (pH 6.3); 0.87 gr (0.005 mol) K_2HPO_4 950 ml saf suda çözüldü. 1 M HCl ile pH 6.3'e kadar titre edildi ve son hacim destile su ile 1L'ye tamamlandı.

3) Afinite jeli sentezinde kullanılan tamponlar: 0.1 M $NaHCO_3$ tamponu (pH 10.0); 8.401 gr (0.1 mol) $NaHCO_3$ 950 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 10.0'a getirildi ve son hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

0.2 M $NaHCO_3$ tamponu (pH 8.8); 8.401 gr (0.1 mol) $NaHCO_3$ 450 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 8.8'e getirildi ve son hacim destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

0.01 M Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.0); 1.42 gr (0.01 mol) Na_2HPO_4 950 mL destile suda çözülerek, 1 N NaOH ile pH'sı 6.0'a getirildi ve son hacim destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

4) Afinite jelinin dengelenmesi ve yıkanması için kullanılan tamponlar: 0.05 M fosfat tamponu (pH 5.00); 3.55 gr (0.025 mol) Na_2HPO_4 450 mL destile su içinde çözülerek pH'sı 5.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

0.05 M fosfat tamponu (pH 6.00); 3.55 gr (0.025 mol) Na_2HPO_4 450 mL destile su içinde çözülerek pH'sı 6.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

5) Afinite kromatografisinde jele bağlanmış PPO enziminin elusyonu için kullanılan çözelti: 0.05 M Na_2HPO_4 /1 M NaCl fosfat tamponu (pH 8.00); 3.55 gr (0.025 mol) Na_2HPO_4 ve 29.25 gr (0.5 mol) NaCl 450 mL destile su içinde çözülerek pH'sı 8.00'a getirilerek son hacmi destile su ile 500 mL'ye tamamlandı.

6) Optimum pH ve sıcaklık çalışmalarında kullanılan pH'sı 4-9 arasında olan tampon çözeltiler: pH 4-4.5 aralığında 0.1 M sitrat/0.2 M K_2HPO_4 tamponu; Bu tampon için 2.94 gr sodyum sitrat (0.01 mol), 3.48 gr (0.02 mol) K_2HPO_4 80 ml saf suda çözülerek 1 M NaOH veya 1 M HCl yardımıyla istenen pH'ya kadar titre edildi ve daha sonra saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlandı.

pH 5-7 aralığında 0.2 M fosfat tamponu; Bu tampon çözelti için 3.48 gr K_2HPO_4 80 ml saf suda çözüldü, 1 M HCl ile çözelti istenen pH'ya ayarlandıktan sonra saf su ile hacim 100 mL'ye tamamlandı.

pH 7.5-9 aralığında 0.2 M Tris tamponu; Bu tampon çözelti için 12.114 gr (0.1 mol) Tris 400 ml saf suda çözülerek, bu çözeltden 40'ar mL alındı, 0.1 M HCl ile çözelti istenen pH'ya ayarlandıktan sonra saf su ile 50'şer mL'ye tamamlandı ve böylece değişik pH'lı seri Tris tamponları hazırlandı.

7) Substrat Çözeltileri: Her bir substrat çözeltisi 10 mL, 0.1 M olacak şekilde hazırlandı. Bu amaçla 0.11 gr (1×10^{-3} mol) katekol, 0.124 gr (1×10^{-3} mol) 4-metil katekol ve 0.126 gr (1×10^{-3} mol) pirogallol alınarak her biri ayrı ayrı son hacim 10 mL olacak şekilde destile su ile çözüldürüldüler.

8) Protein tayininde kullanılan standart serum albumin çözeltisi (1 mg/mL): 25 mg standart serum albumin 25 mL saf suda çözüldü.

9) Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti: 100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 mL etanolde çözüldü. Bu çözeltiliye 100 mL % 95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi destile su ile 1 L'ye tamamlandı.

10) Stok inhibitör çözeltileri: İnhibisyon çalışmalarında kullanılan inhibitör çözeltileri Çizelge 2.1'de belirtilen miktar ve konsantrasyonlarda hazırlandı.

Çizelge 2.1 İnhibisyon çalışmalarında kullanılan stok inhibitör çözeltilerinin hazırlanışı (Son hacim 10mL).

İnhibitör	Miktar(gr)	Mol sayısı(mol)	Stok çözeltinin konsantrasyonu(M)	İnhibitörün çözündüğü ortam
Sodyum Azid	0.390	6×10^{-3}	0.6	su
Ditiyoeritritol	0.0154	1×10^{-4}	1×10^{-2}	su
4-karboksibenzen sülfanamid	1.006	5×10^{-3}	0.5	1 M Tris tamponu (pH 8.5)
2,4-dikloro-5-sülfamoil benzoik asit	0.2701	1×10^{-3}	0.1	1 M Tris tamponu (pH 8.5)
p-aminobenzoik asit	0.0686	5×10^{-3}	0.05	seyretilik HCl
L-sistein	0.121	1×10^{-3}	0.1	1 M Tris tamponu (pH 8.5)
Sulfosalisilik asit	0.5084	2×10^{-3}	0.2	su
NaEDTA	1.8612	5×10^{-3}	0.5	su
Glutasyon	0.1536	5×10^{-4}	0.05	su
B-merkaptolanol	70 μ L	1×10^{-3}	0.1	su
2-merkaptobenzotiazol	0.1672	1×10^{-3}	0.1	1 M Tris tamponu (pH 8.5)
Benzoik asit	0.2442	2×10^{-3}	0.2	1 M Tris tamponu (pH 8.5)
p-aminometilbenzen sülfanamid	0.2227	1×10^{-3}	0.1	1 M Tris tamponu (pH 8.5)
Etilen glükol	560 μ L	1×10^{-2}	1	su
Sülfanamid	0.172	1×10^{-3}	0.1	1 M Tris tamponu (pH 8.5)

11) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu:

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2.5 mL
% 10'luk SDS	4.0 mL
Gliserol	2.0 mL
β -merkapto etanol	1.0 mL
Bromfenol mavisi	0.01 gr
Destile su	0.5 mL

12) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu:

Tris-HCl	3.0 gr
Glisin	14.4 gr
SDS	1.0 gr

alınarak destile su ile son hacim 1L'ye tamamlanır.

13) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığma jellerinin hazırlanışı: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının hazırlanışı ve kullanılan miktarları Çizelge 2.2'de verilmektedir.

14) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi: 0.66 gr Coomassie brilliant blue R-250, 120 mL metanolde çözüldü. Bu çözeltiye 24 mL saf asetik asit ve 120 mL destile su ilave edildi.

15) SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi: % 7.5 asetik asit, % 5 metanol ve % 87.5 mL destile içermektedir. Bu amaçla 75 mL asetik asit ve 50 mL metanol, 875 mL saf su ile karıştırıldı.

Çizelge 2.2 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayrırma Jeli	Yığıma Jeli
	% 10	% 3
<p><u>Akril amid/Bis</u></p> <p>Akril amid 15 gr Bis 0.4 gr alınarak son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	16.65 mL	2.6 mL
Destile su	20.1 mL	12.2 mL
<p><u>1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)</u></p> <p>Tris-HCl 11.82 gr alınarak pH 8.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	12.5 mL	-
<p><u>0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)</u></p> <p>Tris-HCl 3.94 gr alınarak pH 6.8 oluncaya kadar 0.1 M NaOH ilave edilerek son hacim destile su ile 50 mL'ye tamamlanır.</p>	-	5 mL
<p><u>% 10'lük SDS</u></p> <p>SDS 1 gr alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	0.5 mL	200 µL
<u>TEMED</u>	25 µL	20 µL
<p><u>% 10'lük amonyum persülfat</u></p> <p>Amonyum persülfat 1 gr alınarak son hacim destile su ile 10 mL'ye tamamlanır.</p>	750 µL	400 µL

2.2 YÖNTEMLER

2.2.1 Ham Ekstraktın Hazırlanması

Araştırmada kullanılan meyvelerden dut Kırklareli, yer elması ise Balıkesir'den temin edildi. Meyveler çalışmalarda kullanılincaya kadar derin dondurucuda muhafaza edildi. Ham ekstrakt hazırlanması amacıyla, 50 g meyve 100 mL (% 0.5 polietilen glikol ve 10 mM askorbik asit ihtiva eden) 0.5 M fosfat tamponu (pH 7.30) içinde ev tipi blender ile 2 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenat iki kat tülbentten süzüldü. Süzüntü 20000xg'de +5 C'de 1 saat süreyle santrifüj edildi. Bitki duvarlarını ve selülozik lifli kısmı içeren çökelek atıldı. Elde edilen süpernatant ham ekstrakt olarak kullanıldı.

2.2.2 Amonyum Sülfatla Çöktürme

Amonyum sülfatla çöktürme işlemleri % 0-80 arasında doyunlukta yapıldı. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyum sülfat miktarları aşağıda verilen formülle tespit edildi.

$$\text{gr}_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V : süpernatant hacmi

S₁ : 1'in kesri şeklinde mevcut amonyum sülfat doyunluğu

S₂ : 1'in kesri şeklinde istenilen amonyum sülfat doyunluğu

Çöktürme işleminde kullanılacak katı amonyum sülfat miktarı yukarıdaki formüle göre tespit edildi. Amonyum sülfat çöktürmesi sırasında ham ekstrakta katı (NH₄)₂SO₄ yavaş yavaş ve azar azar katıldı, her ilave sonrasında daha önce katılan

(NH₄)₂SO₄'ın çözülmüş olmasına dikkat edildi. Katı amonyum sülfat katılmasından sonra % 80 doyunluğa getirilen suspansiyon 20000xg'de 1 saat süreyle soğutmalı santrifüjle santrifüjlendi. Tüm ekstrakt bu şekilde santrifüj edildikten sonra tüplerin üzerindeki sıvı kısımlar atıldı. Oluşan çökelek ise, 5 mM fosfat tamponunun (pH 6.30) çözünebildiği en az miktarında çözüldü.

2.2.3 Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen enzim çözeltisi diyaliz torbasına (Sigma Diagnostics, dialysis sacks) yerleştirildi. Enzimin içinde bulunduğu tampona (5 mM fosfat tamponu, pH 6.30) karşı 3-4 defa değiştirilmek suretiyle 24 saat süreyle diyaliz edildi.

2.2.4 PPO Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması

PPO enziminin saflaştırılması için uygulanan metodlardan biriside afinite kromatografisidir. Afinite kromatografisi, bir çeşit adsorpsiyon kromatografisi olup saflaştırılması istenen molekül veya biyolojik ünitenin matriks adı verilen çözünmeyen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Bu sayede saflaştırma; çok zor, yorucu ve bazı hallerde imkansız olan bir çok ayırma işlemlerine gerek olmadan kısa zamanda gerçekleşmekte ve yüksek bir verimle binlerce defa saflaştırılmış bileşikler elde edilmektedir [142].

2.2.4.1 Afinite Jelinin Hazırlanması

Afinite jeli, Sepharose-4B matriksi üzerinde hazırlandı. Sepharose-4B'nin serbest -OH guruplarının modifikasyonunda yaygın olarak CNBr yönteminden yararlanılmıştır [128]. Aynı metot tarafımızdan kullanılarak, Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildikten sonra, tirozinle kovalent modifiye edildi. Reaktif türevde tirozine diazolanmış p-amino benzoik asidin bağlanması gerçekleştirildi. Burada, tirozin afinite jelinin uzantı kolunu, p-aminobenzoik asit ise enzimi spesifik olarak bağlayan kısmını oluşturmaktadır. p-aminobenzoik asit polifenol oksidaz enziminin spesifik

bir inhibitörü olup, afinite jelinin yapısına girerek söz konusu enzimin yüksek oranda saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır. Afinite jeli aşağıdaki prosedüre göre hazırlandı;

- **Sepharose-4B'nin aktive edilmesi ve tirozin bağlanması:**

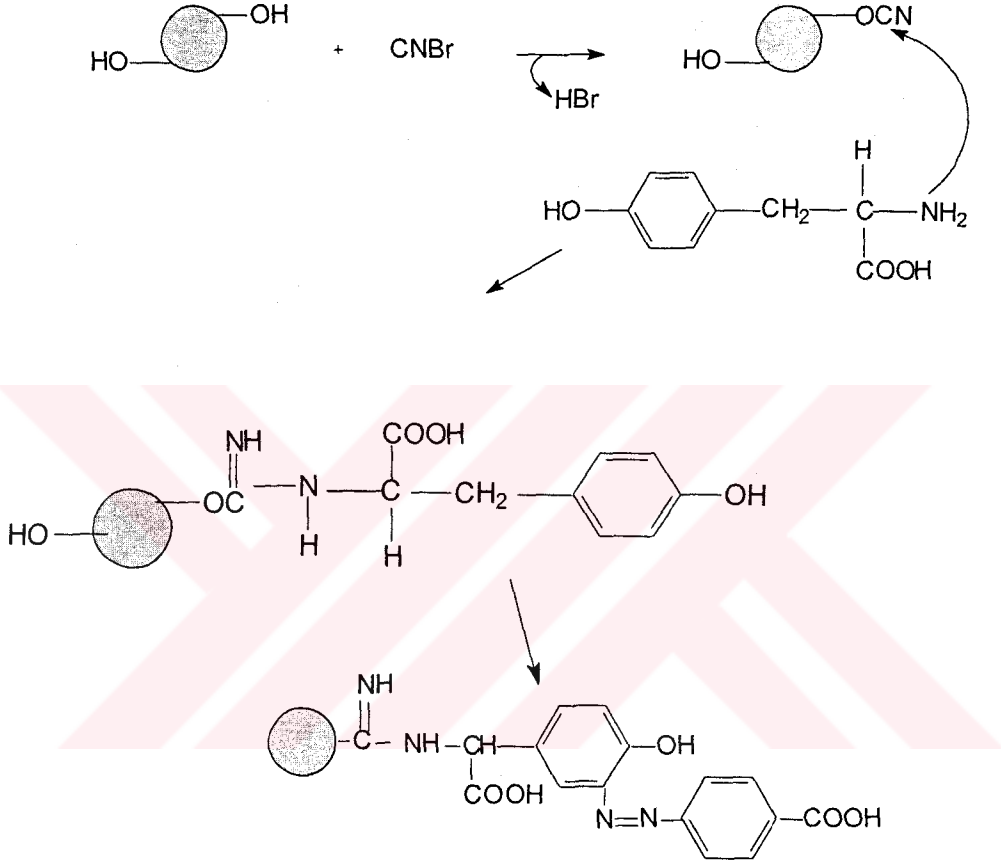
10 mL Sepharose-4B jeli, saf su ile iyice yıkanarak dekante edildi. Eşit hacimdeki destile su ile birleştirildi. Karıştırılmakta olan jel süspansiyonuna 4 g toz haline getirilmiş CNBr'ün hepsi birden katıldı. pH metre kullanılarak süspansiyonun pH'sı 4 M NaOH ile hemen 11'e çıkarıldı ve reaksiyon bu pH'da muhafaza edildi. Reaksiyona pH değişmeyinceye kadar devam edildi (10-15 dakika). Çok miktarda buz süspansiyona katıldı ve karışım bir buchner hunisine nakledildi. Daha sonra 250 mL soğuk 0.1 M NaHCO₃ tampon çözeltisi ile (pH 10.0) ile yıkandı 20 mL'sinde 15 mg tirozin içeren aynı tamponun soğuk çözeltisi ilave edilerek, yavaşça karıştırılan süspansiyondan, bağlanma verimliliğini belirleme amacıyla, her 15 dakikada içinde jel bulunmayan 0.2 mL örnek alındı ve 1 M NaOH çözeltisi ile 20 mL'ye tamamlanarak 294 nm'de absorbans değişimi izlendi. 90. dakikadan sonra absorbansda önemli bir farklanma olmadığı için, bağlanma reaksiyonu 90 dakika olarak belirlendi. Bundan sonra süspansiyon, 16 saat 4°C'de bekletildi. Bu sürenin bitiminde yıkama suyu 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar bol su ile yıkandı. Böylece reaksiyona girmeyen tirozin tamamen uzaklaştırılmış oldu. Yıkama, 100 mL 0.2 M NaHCO₃ tamponu ile (pH 8.80) tekrarlandı. Tirozinle modifiye Sepharose-4B, aynı tamponun 40 mL'si içine alındı.

- **p-aminobenzoik asidin bağlanması:**

25 mg p-aminobenzoik asit, 0°C civarında 10 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü. 75 mg NaNO₂ ihtiva eden 0°C'deki 5 mL çözelti, p-aminobenzoik asit çözeltisine damla damla katıldı. 10 dakika reaksiyondan sonra diazolanmış bulunan p-aminobenzoik asit, 40 mL Sepharose-4B-L- tirozin süspansiyonuna ilave edildi. pH 9.5'a çıkarılarak sabit tutuldu ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 1 L saf su ve ardından 200 mL 0.01 M Na₂HPO₄ (pH 6.0) tamponu ile yıkandı ve aynı tamponda muhafaza edildi.

Afinite jelinin sentezi aşamasındaki her bir türevin IR spektrumu çekildi ve EK A, EK B, EK C ve EK D’de verildi.

Reaksiyonların açık formülleri aşağıda gösterilmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Sepharose-4B'nin modifikasyon basamakları.

2.2.4.2 Enzim Çözeltisinin Afinite Kolonuna Tatbiki ve Enzimin Elüsyonu

Hazırlanan afinite jeli 1x10 cm boyutlarındaki bir kolona paketlenerek 0.05 M fosfat tamponu (pH 5.00) ile, üstten ilave edilen ve alttan toplanan tamponun pH değerleri birbirleriyle eşit oluncaya kadar yıkanarak dengeleme sağlandı. Diyaliz sonrası elde edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edildi ve yine 0.05 M fosfat

tamponu (pH 5.00) ile yıkandı ve 3'er mL halinde tüplere alındı. Böylece polifenol oksidazın büyük kısmı afinite jeline tutunmuş ve diğer safsızlıklar uzaklaşmış oldu. Toplanan tüplerde 280 nm'de protein ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapıldı. Daha sonra 0.05 M Na₂HPO₄ /1 M NaCl tamponu (pH 8.00) ile enzim elüsyonu yapıldı ve 3'er mL halinde tüplerde fraksiyonlandı. Elüatlarda bradford metoduyla kantitatif, 280 nm'de kalitatif protein ve 420 nm'de enzim aktivite tayini yapıldı.

Yukarıda anlatılan prosedürün aynısı bu kez kolon dengeleme tamponu olarak 0.05 M Na₂HPO₄ (pH 6.00) kullanılarak uygulandı. Elde edilen sonuçlar grafik halinde Şekil 3.3-3.8 ve 3.52-3.57'de verildi.

2.2.5 Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) İle Enzim Saflığının Kontrolü

Yer elması ve dut PPO enzimlerinin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasından sonra iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; yağma jeli % 3, ayırma jeli % 10 konsantrasyonlarında olacak şekilde kesikli sodyum dodesil sülfat jel elektrofrez (SDS-PAGE) Laemelli tarafından belirtilen yöntemle yapılarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi [143].

Bu amaçla elektrofrez cam plakaları önce su, sonra etil alkol ile iyice temizlendi. Daha sonra plakalar arasına plastik aralık oluşturucusu yerleştirilerek iki cam plaka birbiri üzerine konuldu ve kışkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Çizelge 2.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan ayırma jeli plakalar arasına üstten 2-3 cm kalana kadar enjektörle döküldü. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için n-bütanol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra (yaklaşık 15 dakika) üst yüzeydeki n-bütanol döküldü. Daha sonra cam plakaların arası tamamen doluncaya kadar polimerleşmiş ayırma jelinin üzerine yağma jeli ilave edildi. Jel kasetindeki yükleme jelinin üzerine tarak dikkatlice yerleştirilerek jelin polimerleşmesi beklendi (yaklaşık 30 dakika). Yükleme jeli polimerleştikten sonra tarak, kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kuyucuklar önce saf suyla sonra

tank tamponuyla yıkandı. Polimerize jellerin bulunduğu kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Afinite kromatografisi sonucunda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite gösterenler birleştirilerek amonyum sülfatla % 80 doygunluğa getirildi. Elde edilen çözelti toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Lizozim (14.3 kDA), β-laktoglobulin (18.4 kDA), tripsinojen (24 kDA), pepsin (34.7 kDA) , ovalbumin (45 kDA) ve sığır serum albumin (66 kDA) içeren standart protein çözeltisi, içerisinde her birinden 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 µL olacak şekilde 1:1 oranında numune tamponuyla karıştırıldı. Jele yüklenecek numuneler 3 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Numuneler soğutularak enjektörle kuyucuklara yüklendi. Elektroforez güç kaynağına bağlanarak 80 volt'a ayarlandı. Proteinlerin jeldeki hareketini incelemeye yarayan numune tamponu içindeki boyaya ait bant yükleme jelinden ayırma jeline vardığında voltaj 150 volt'a yükseltildi. Bromfenol mavisinden kaynaklanan mavi bant jelin altına 0.5 cm kalana kadar yürütüldükten sonra akım kesilerek yürütme durduruldu. Cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı yağma jel kesilip ayrıldıktan sonra protein bantlarını içeren ayırma jeli renklendirme çözeltisi içine konuldu ve 1.5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra jel renklendirme çözeltisinden çıkarılarak renksizleştirme çözeltisine kondu. Belirli aralıklarla değiştirmek suretiyle jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar bu çözelti içinde çalkalandı. Jel renksizleştirme çözeltisinden çıkarıldıktan sonra fotoğrafı çekildi (Şekil 3.9-3.11). Tabii şartlarda poliakrilamid jel elektroforezi de Leamelli tarafından belirtilen yöntemle yürütme ve numune tamponuna SDS katılmadan ve numuneler ısıtılmadan gerçekleştirildi.

2.2.6 Protein tayini

2.2.6.1 Kalitatif Protein Tayini

Çalışmamızda yapılan kromatografi işlemleri sonucunda elde edilen eluatlar eşit hacimde alınıp, bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metodla yapılan kalitatif protein tayininin temel prensibi, proteinlerin yapısında bulunan aromatik halkaya sahip olan amino asitlerin (fenilalanin, tirozin ve triptofan) 280 nm’de UV ışınlarını absorblamaları esasına dayanmaktadır [144]. Fraksiyonlar kuvarz küvetlere alınarak, absorbansları spektrofotometrede köre karşı ölçüldü. Proteinin içinde bulunduğu tampon kör olarak alındı.

2.2.6.2 Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Ekstraksiyon ve saflaştırma basamaklarında elde edilen çözeltilerdeki protein miktarı tayinleri, bu yöntemle belirlendi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm’de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır [145]. Bu yöntemin, diğer protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein-boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır.

Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL’inde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albumin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. 5 mM fosfat tamponu (pH 6.30) ile tüm tüplerin hacimleri 0.1 mL’ye tamamlandı. 5 mL Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 10 dakika sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0.1 mL’lik 5 mM fosfat tamponu (pH 6.30) olan 1. tüp kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 3.1).

Hazırlanan enzim çözeltilerinden 0.1’er mL 2 ayrı tüpe alınarak üzerlerine 5’er mL Coomassie reaktifi ilave edildi. Vorteksde karıştırıldı. 10 dakika sonra 595

nm'de absorbansları ölçüldü. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

2.2.7 PPO Enziminin Aktivite Tayini

Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 0.2 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 2.8 mL tampon + substrat (0.1 M katekol, 0.1 M 4-metil katekol veya 0.1 M pirogallol) çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm'de köre karşı bir dakikada absorbansda meydana gelen değişme okundu. 1 Enzim Ünitesi (U) reaksiyonun olduğu küvette 1 dakikada meydana gelen 0.001'lik artış olarak tanımlandı. Aktivite birimi olarak "1 mL enzim çözeltisi başına 1 dakikada absorbansta meydana gelen 0.001 birimlik değişme" kullanıldı.

2.2.8 PPO Enzimi İle İlgili Kinetik Çalışmalar

PPO enziminin kinetik özelliklerini araştırmak için üç farklı substrat için, optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlendi. Elde edilen verilerden yararlanarak her bir substratın değişik pH'lardaki aktivasyon enerjileri bulundu. Enzimin sıcaklığa bağımlı denatürasyon ve renatürasyon özellikleri araştırıldı. Kullanılan her bir substrat için K_M ve V_{max} değerleri tayin edildi. Ayrıca farklı inhibitörlerin, optimum şartlarda, I_{50} , K_i değerleri ve inhibisyon türleri saptandı.

2.2.8.1 Optimum pH ve Sıcaklık Çalışması

PPO enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık ve pH değerlerini belirlemek amacı ile değişik pH değerlerinde (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) üç farklı substrat (katekol, 4-metil katekol ve pirogallol) kullanarak 20, 30, 35, 45, 55, 65 ve 75 °C'deki reaksiyon hızları ayrı ayrı belirlendi. Her ölçüm iki kez tekrarlanıp çıkan değerlerin ortalaması alındı. Elde edilen değerlerden yararlanarak aktiviteler bölüm 2.2.7'de anlatıldığı gibi hesaplandı. Böylece PPO enzimi için optimum pH ve sıcaklık değerleri tek bir çalışma ile tespit

edildi. Elde edilen sonuçlar grafik (Şekil 3.12-3.18 ve 3.58-3.64) ve tablo (Çizelge 3.2-3.10 ve 3.32-3.40) halinde verildi.

2.2.8.2 Aktivasyon Enerjisinin Hesaplanması

Aktivasyon enerjilerinin hesaplanmasında Arrhenius denklemi kullanıldı.

$$\text{Log}k = - \frac{E_A}{2.303 \times R} \frac{1}{T}$$

Burada;

k : T(K) sıcaklığındaki reaksiyon hızı

R : İdeal gaz sabiti (1.987 kal mol⁻¹ K⁻¹)

E_A: Aktivasyon enerjisi (kal mol⁻¹)'dir.

Optimum pH ve sıcaklığın belirlenmesi çalışmalarından yararlanılarak her bir substrat için temperatüre bağımlı reaksiyon hızlarından aktivasyon enerjileri hesaplandı.

Yapılan optimum pH ve sıcaklık çalışmasından elde edilen aktivite değerlerinin (U/mLdak) logaritması, reaksiyon sıcaklıklarının (°K) tersine (1/T) karşı grafiği çizildi. Arrhenius denkleminde yararlanılarak grafiklerin eğiminden (-E_A/2.303R) aktivasyon enerjileri hesaplandı. Çizilen grafikler Şekil 3.23-3.28 ve 3.69-3.74'de ve elde edilen aktivasyon enerjisi değerleri de Çizelge 3.11 ve 3.41'de verildi.

2.2.8.3 PPO'nun Sıcaklığa Bağımlı Denatürasyon ve Renatürasyon Özelliklerinin Araştırılması

PPO enziminin sıcaklığa bağımlı denatürasyon özelliğini belirlemek amacıyla; 40, 50, 60, 70 ve 80 °C'lerde 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakika süreyle inkübasyonu sonrası koruduğu aktivite değerleri, 10 mM katekol substratı kullanarak, standart aktivite ölçüm koşullarında saptandı.

Her bir sıcaklıktaki bekleme süresi sonunda yapılan ölçümlerden elde edilen aktivite değerleri % aktiviteye dönüştürüldü (Çizelge 3.12 ve 3.42). Zamana karşı % korunan aktivite grafiği çizildi (Şekil 3.29 ve 3.75)

Renatürasyon işlemlerinde ise denatürasyon çalışmasında kullanılan ve bahsedilen sıcaklıklarda bekletildikten sonraki enzim çözeltisi 22 °C'ye kadar soğutuldu. 22° C'de enzim aktiviteleri 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakika zaman aralıklarında, 10 mM katekol substratı kullanarak, ölçüldü. Elde edilen değerler % aktiviteye dönüştürüldü (Çizelge 3.13 ve 3.43). 22 °C'deki inkübasyon süresine karşılık % aktivite grafiği çizildi (Şekil 3.30 ve 3.76)

2.2.8.4 Farklı Substratlar İçin Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla optimum şartlarda katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratlarının beş farklı konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı.

$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak (Çizelge 3.14-3.16 ve 3.44-3.46) her bir substrat için Linewear-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.31-3.33 ve 3.77-3.79). K_M ve V_{max} değerleri grafiklerin denklemlerinden yararlanılarak bulundu. Bulunan K_M , V_{max} ve V_{max}/K_M değerleri Çizelge 3.17 ve 3.47' de verildi.

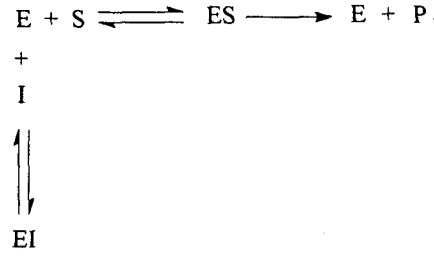
2.2.8.5 İnhibitörler İçin I_{50} Değerlerinin Bulunması

Farklı inhibitörlerin I_{50} değerlerini bulmak için, optimum şartlarda katekol substratının 10 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer % 100 aktivite olarak kullanıldı. Değişik inhibitör konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbanslar 420 nm'de köre karşı okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviteler hesaplandı (Çizelge 3.18-3.24 ve 3.48-3.53). % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 3.34-3.47 ve 3.80-3.91). Bu

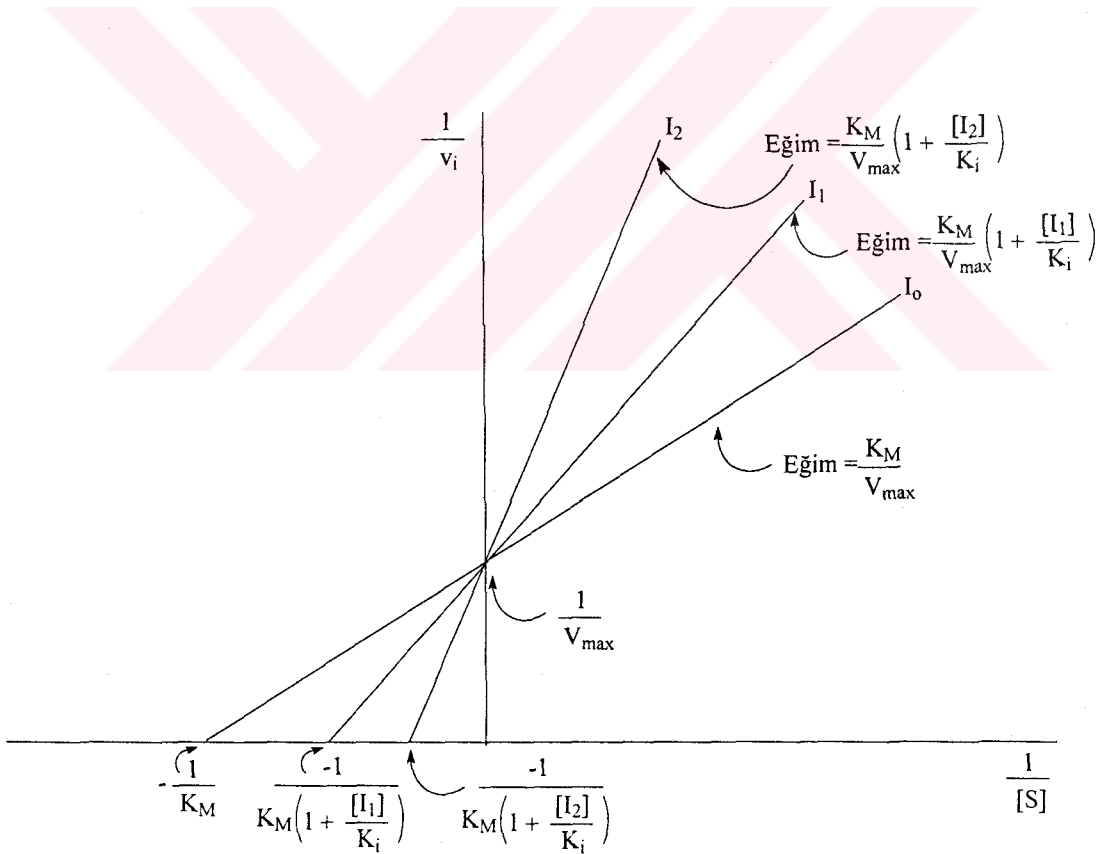
grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için I_{50} değerleri hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 3.25 ve 3.54'de verildi.

2.2.8.6 İnhibitörler İçin K_i Değerlerinin Bulunması

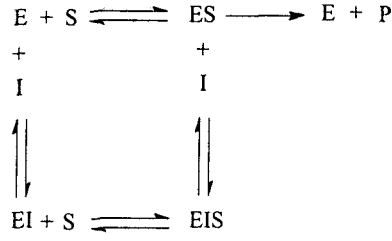
Farklı inhibitörler için K_i değerlerinin bulunması için önce inhibitörsüz ortamda optimum şartlarda beş farklı katekol substratı konsantrasyonu kullanarak aktiviteler bulundu. Daha sonra her bir inhibitör için 3 değişik sabit inhibitör konsantrasyonunda optimum şartlarda aktiviteler katekol substratı kullanılarak tespit edildi (Çizelge 3.26-3.29 ve 3.55-3.63) $1/V$ ve $1/[S]$ değerlerinden Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.48-3.51 ve 3.92-3.100). Bu grafiklerden yararlanarak inhibisyon türleri ve K_i değerleri tespit edildi (Çizelge 3.30 ve 3.64). K_i değerleri yarışmalı (kompetatif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde eğime eşit olan $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarı yarışmalı (unkompetatif) inhibisyon için eğrinin $1/V$ eksenini kestiği noktayı veren $1/V_{max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden, yarışmasız (nonkompetatif) inhibisyon için Lineweaver-Burk eğrisinde eğime eşit olan $K_M/V_{max}(1+[I]/K_i)$ ifadesinden yararlanarak hesaplandı (Şekil 2.2-2.4.). Denklemlerde kullanılan K_M ve V_{max} değerleri inhibitörsüz ortamda bulunan değerlerdir.



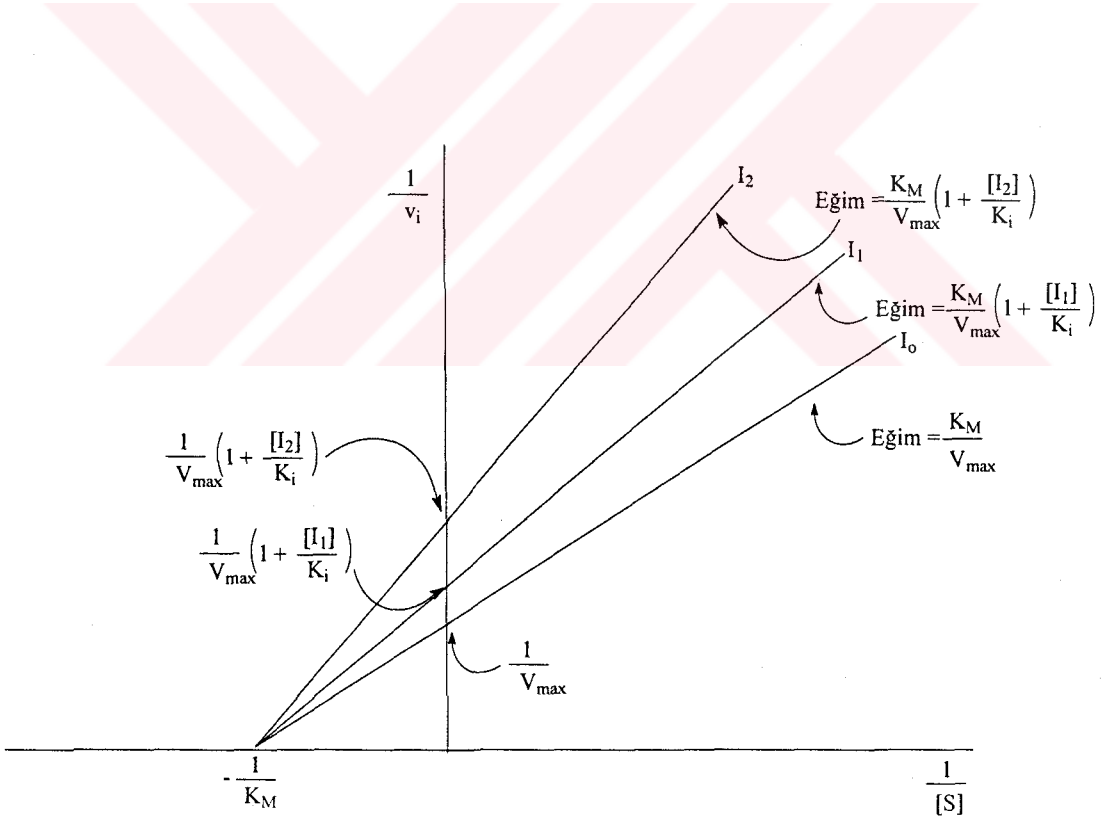
$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$



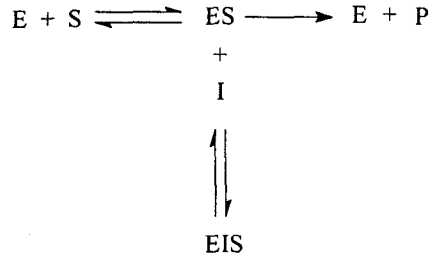
Şekil 2.2 Kompetatif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği.



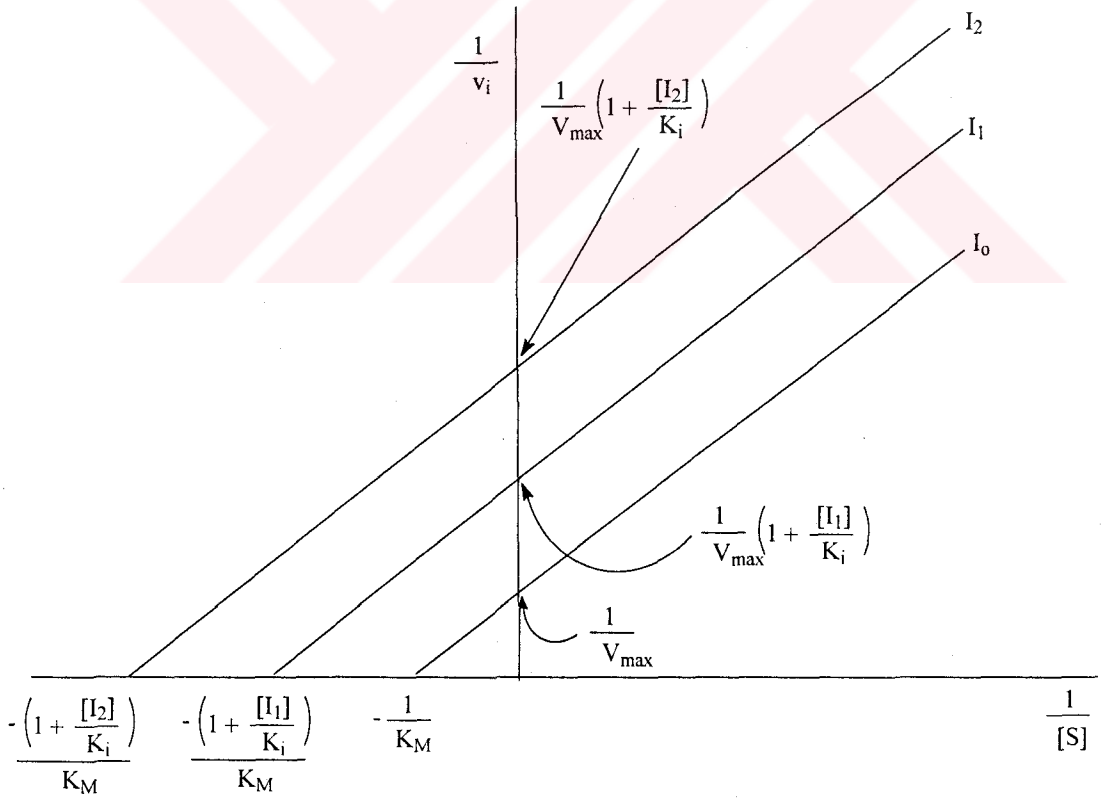
$$\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_M}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$



Şekil 2.3 Nonkompetatif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği.



$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

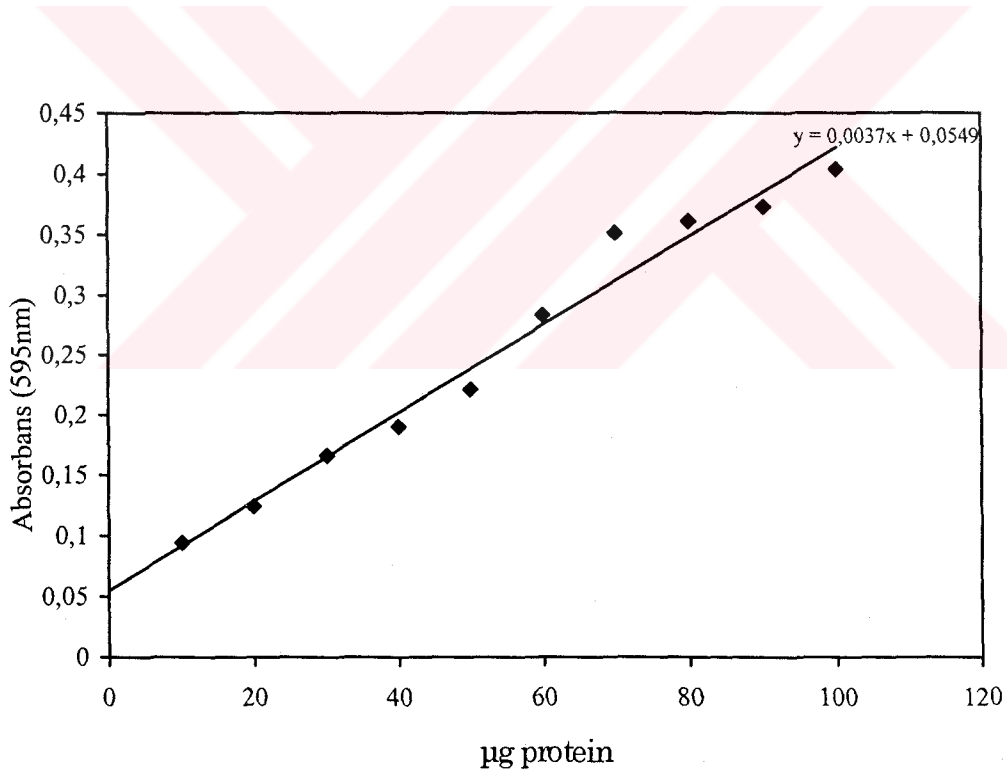


Şekil 2.4 Unkompetatif inhibisyon için Lineweaver-Burk grafiği.

3. BULGULAR

3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

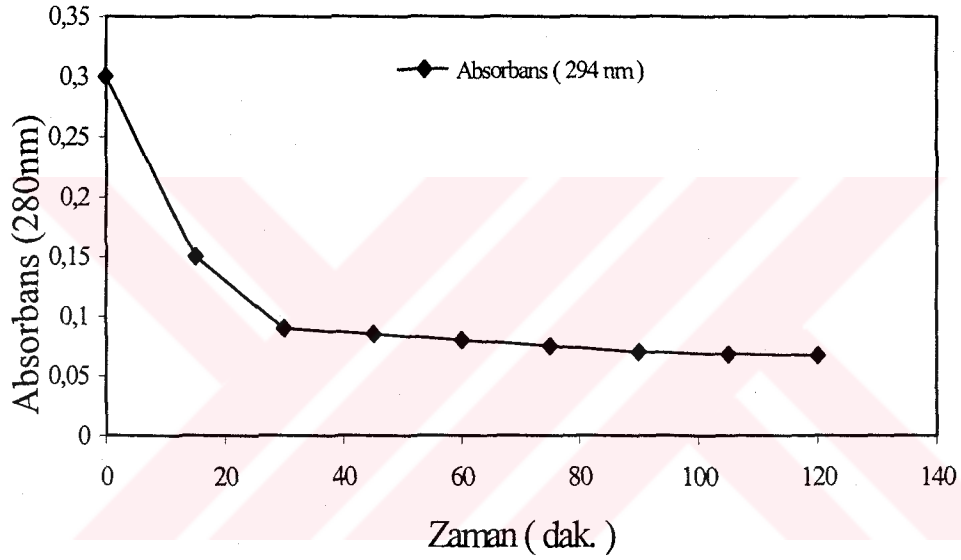
Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Standart grafik bölüm 2.2.6.2'de açıklandığı gibi hazırlandı. Ekstraksiyon sonrası elde edilen enzim çözeltisi ve saflaştırma basamakları sonunda ki enzim çözeltilerinin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki μg proteine karşılık gelen absorban değerleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Bradford yöntemine göre protein standart grafiği

3.2 L-tirozinin Sepharose-4B'ye Bağlanma Reaksiyon Süresinin Belirlenmesi

Bölüm 2.2.4.1'de belirtilen prosedürle aktifleştirilen Sepharose-4-B'ye L-tirozinin bağlanma zamanını belirlemek amacı ile belirli sürelerde tepkime kabından alınan örnekler, 294 nm'de absorbansları okunarak grafiğe geçirildi. Şekil 3.2'de görüldüğü gibi 90. dakikadan sonra bağlanan L-tirozin miktarında önemli bir değişme olmadığı için, bu süre bağlanma zamanı olarak alındı.



Şekil 3.2 L-tirozinin aktifleştirilmiş Sepharose-4B'ye bağlanma süresini gösteren grafik

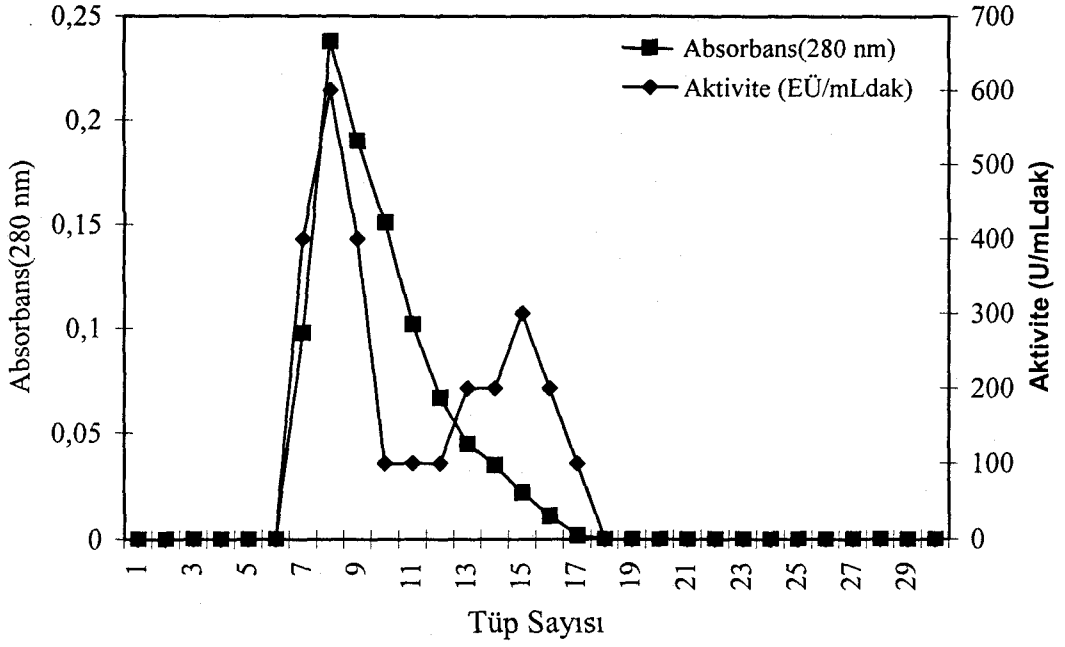
3.3 Yer Elması PPO (YPP0) Enzimi İle İlgili Çalışmaların Sonuçları

3.3.1 YPP0 Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması

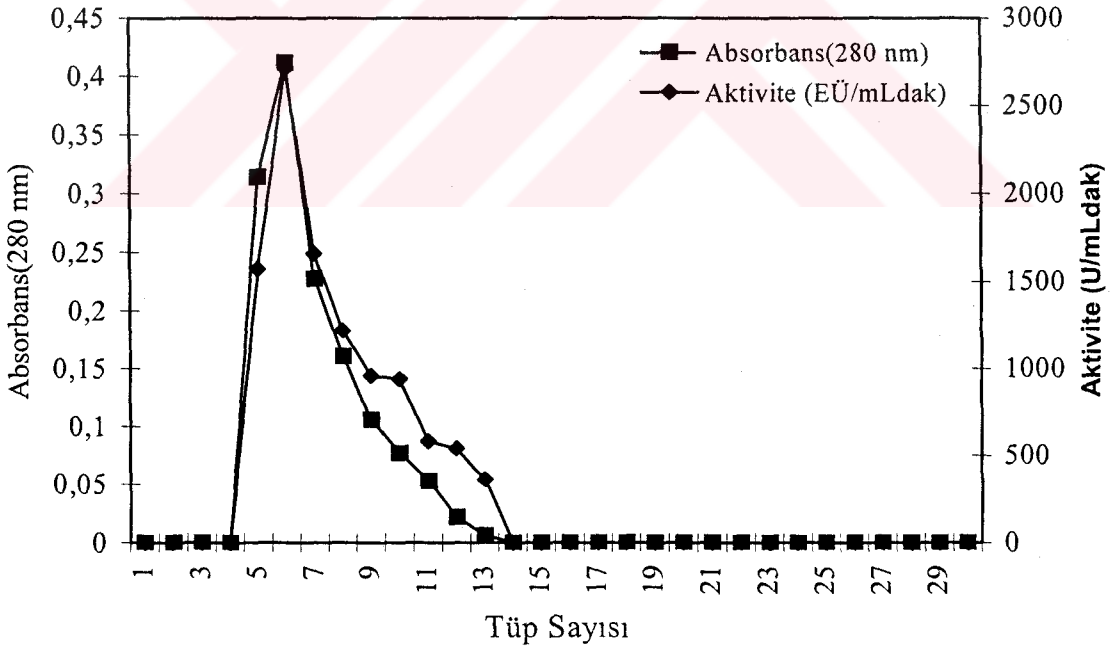
3.3.1.1 YPP0 Enziminin 0.05 M Na₂HPO₄ Tamponu (pH 5.00) İle Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması

Bölüm 2.2.4.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan afinite kolonu önce 0.05 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 5.00) ile dengelendi. Kolonun dengeleme işlemi bittikten sonra, jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi. Diyaliz işleminden sonra elde edilen yer elması enzim çözeltisi kolona tatbik edildi. Kolon 0.05 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 5.00) ile yıkandı. Altan gelen yıkama çözeltisi 3'er mL halinde tüplere fraksiyonlandı. Yıkama işlemine 280 nm'deki absorbands sıfır oluncaya kadar devam edildi. Yıkama tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 420 nm'de de aktivite tayini yapıldı. Elde edilen değerlerin tüp numarasına karşı grafiği çizildi (Şekil 3.3-3.4 ve 3.7).

Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra elüsyon işlemine geçildi. Elüsyona başlamadan önce jel üzerindeki tampon çözeltisi jel seviyesine kadar indirildi ve elüsyon 0.05 M Na₂HPO₄ /1 M NaCl tamponu (pH 8.00) ile gerçekleştirildi. Kolondan alınan elüatlar 3'er mL halinde tüplere alındı. Elüsyon işlemine 280 nm'deki absorbands sıfır oluncaya kadar devam edildi. Elüsyon tamponu kör olarak kullanılarak her bir tüpte 280 nm'de kalitatif protein tayini ve 420 nm'de de aktivite tayini yapıldı (Şekil 3.4). Afinite kromatografisi sonunda enzim aktivitesine rastlanan tüpler birleştirildi. Kolona tatbik edilen numune ve birleştirilen elüat çözeltileri için bradford metoduyla kantitatif protein ve aktivite tayinleri yapılarak spesifik aktiviteler ve saflaştırma oranları tespit edildi. Sonuçlar Çizelge 3.1'de verildi.



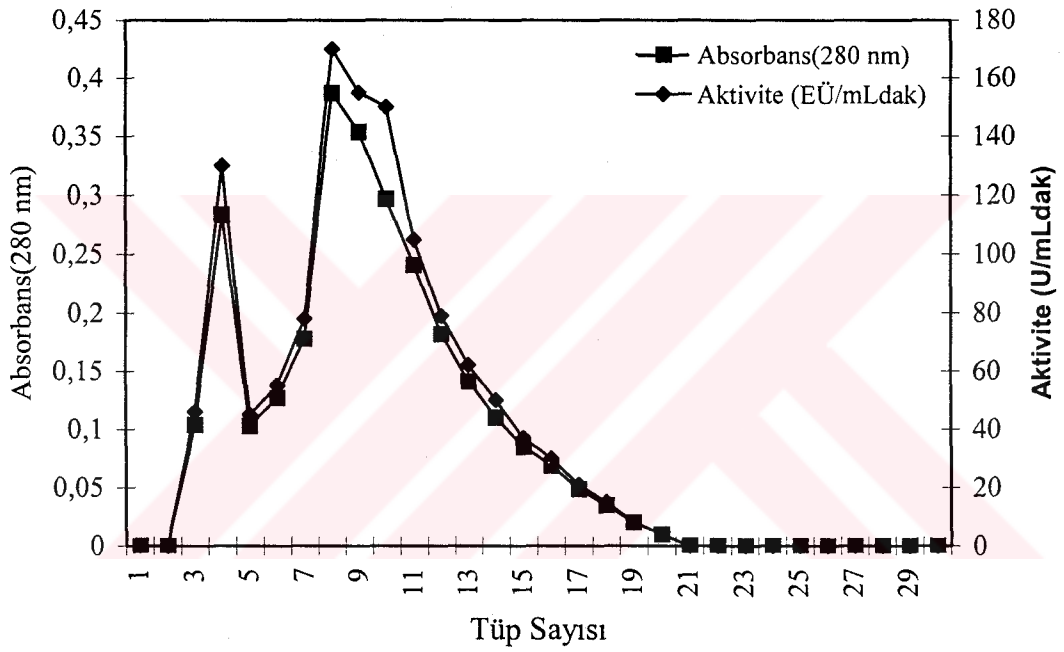
Şekil 3.3 Na₂HPO₄ tamponu (pH 5.00) ile dengelenmiş afinite kolonunun yıkama çözeltilerindeki YPPO'nun absorbans-aktivite grafiği



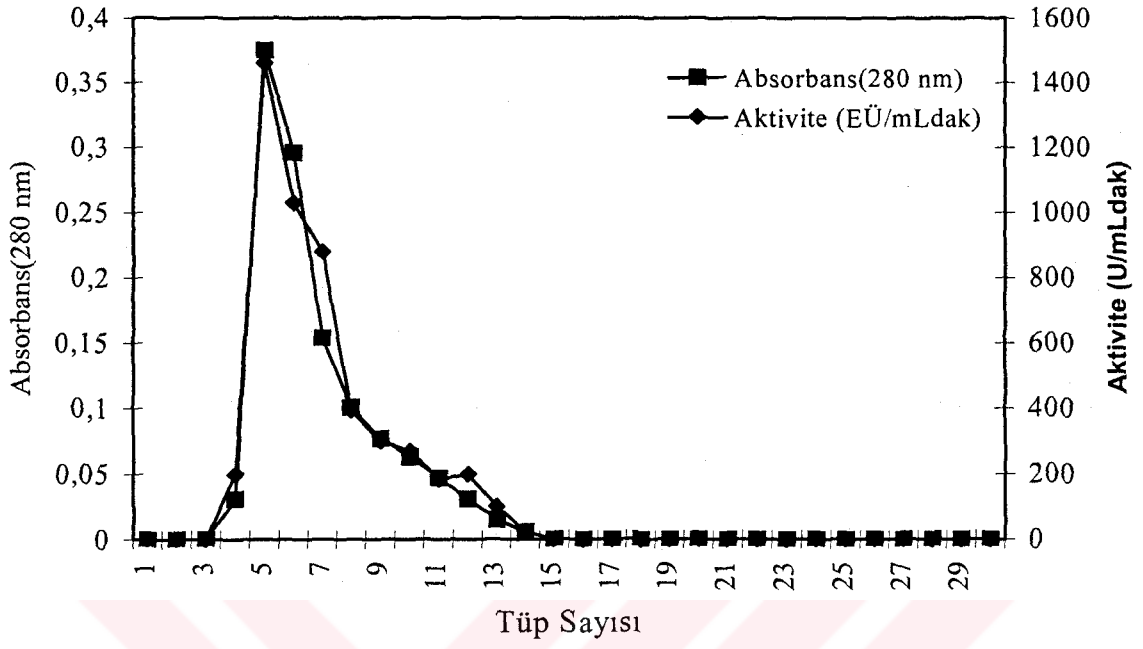
Şekil 3.4 Na₂HPO₄ tamponu (pH 5.00) ile dengelenmiş afinite kolonundan saflaştırılan YPPO'nun absorbans-aktivite grafiği

3.3.1.2 YPPO Enziminin 0.05 M Na₂HPO₄ Tamponu (pH 6.00) İle Dengelenmiş Kolondan Safılaştırılması

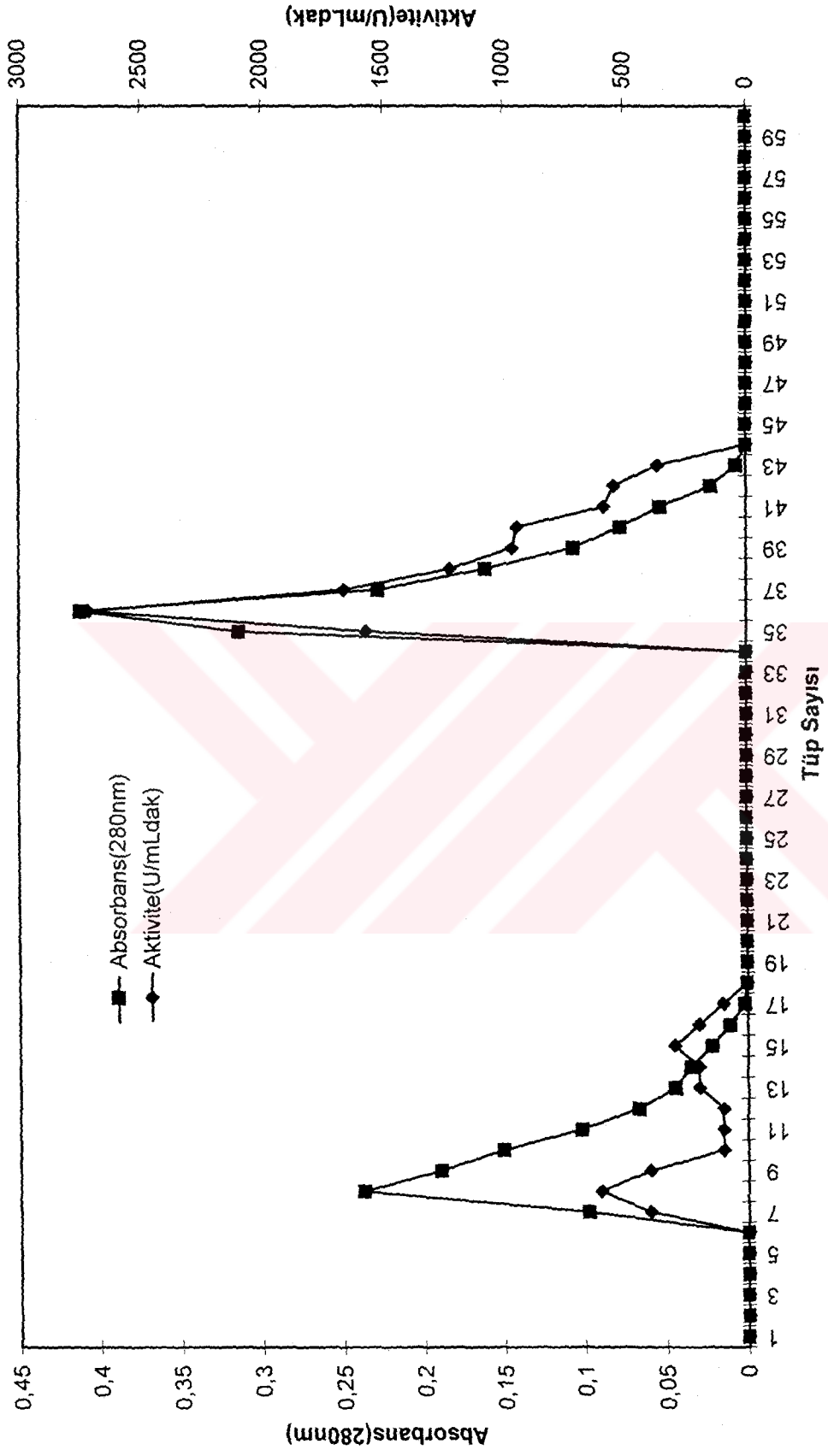
Bölüm 3.3.1.1’de anlatılan işlemlerin aynısı bu kez kolon dengeleme ve yıkama tamponu olarak 0.05 M Na₂HPO₄ tamponunun (pH 6.00) kullanılmasıyla gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.5-3.6, 3.8 ve Çizelge 3.1’de verildi.



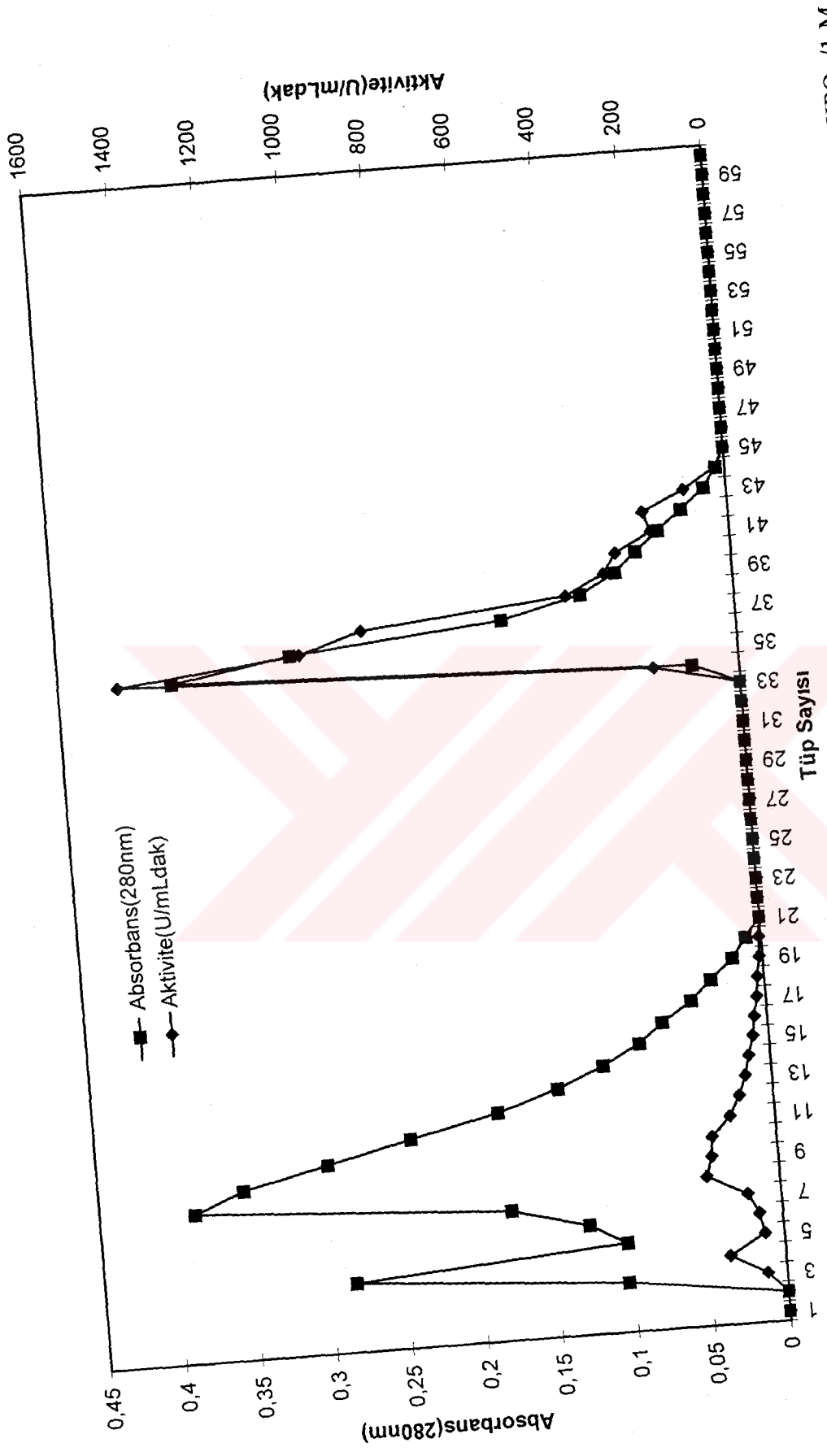
Şekil 3.5 Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.00) ile dengelenmiş afinite kolonunun yıkama çözeltilerindeki YPPO'nun absorbans- aktivite grafiği



Şekil 3.6 Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.00) ile dengelenmiş afinite kolonundan saflaştırılan YPPO'nun absorbans-aktivite grafiği



Şekil 3.7 Afinite kolonunun Na_2HPO_4 tamponu (pH 5.00) ile yıkanması işleminden sonra YPPO enziminin 0.05 M Na_2HPO_4 / 1 M tamponu (pH 8.00) ile elusyonu



Şekil 3.8 Afinite kolonunun Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.00) ile yıkanması işleminden sonra YPPO enziminin 0.05 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/1$ M tamponu (pH 8.00) ile elusyonu

Çizelge 3.1 YPPO enziminin saflaştırılma tablosu

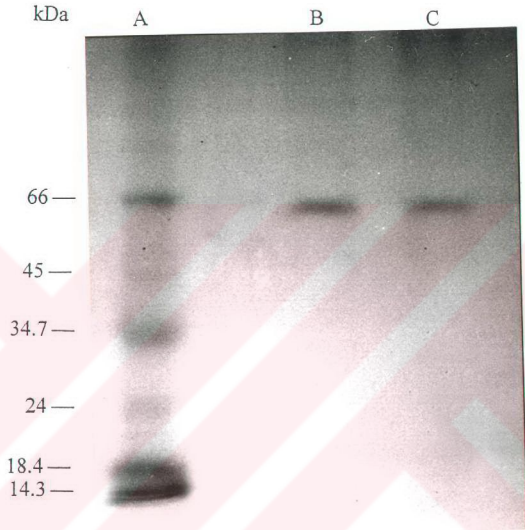
Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Aktivite (U/mLdak)	Toplam Aktivite	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg prot)	Verim (%)	Saflaştırma derecesi
Ekstrakt	5	8014	40070	0.95	4.75	8435.78	-	-
Afinitite kromatografisi (pH 5.0)	12	2710	32520	0.0032	0.0384	846875	81.16	100.39
Afinitite kromatografisi (pH 6.0)	10	1460	14600	0.0029	0.029	503448.28	36.44	59.68

3.3.2 YPPO ve DPPO Enzimlerinin SDS Poliakrilamid ve Tabii Şartlarda Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

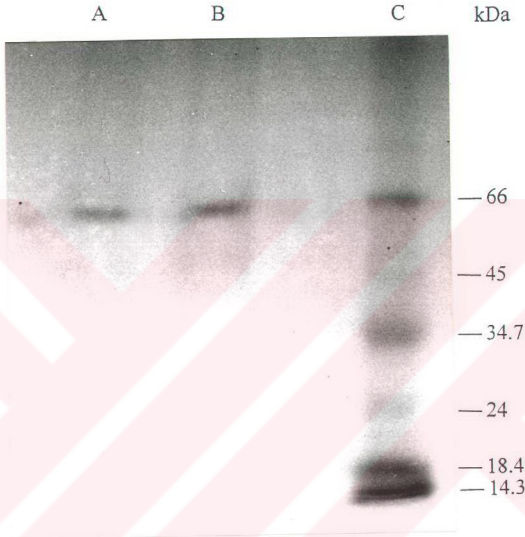
Afinite kolonundan saflaştırılan YPPO ve DPPO enzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla bölüm 2.2.5'de anlatıldığı Şekilde hazırlanan SDS ve tabii Şartlarda poliakrilamid jel elektrofrezine yer elması ve dut meyvelerinden saflaştırılan PPO enzim numuneleri tatbik edildi. Protein bantları içeren jellerin fotoğrafları ęekildi (Şekil 3.9-3.11).



Şekil 3.9 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan YPPO ve DPPO enzimlerinin tabii Şartlarda jel elektrofrezisi. **A:** siğir serum albumin (66 kDA), **B:** YPPO, **C:** DPPO



Şekil 3.10 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan YPPO enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi. **A:** Molekül ağırlığı tespitinde kullanılan standart proteinler; lizozim (14.3 kDA), β -laktoglobulin (18.4 kDA), tripsinojen (24 kDA), pepsin (34.7 kDA) , ovalbumin (45 kDA), sığır serum albumin (66 kDA). **B ve C:** YPPO



Şekil 3.11 Afinite kromatografisi ile saflaştırılan DPPO enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi. **A** ve **B**: DPPO. **C**: Molekül ağırlığı tespitinde kullanılan standart proteinler; lizozim (14.3 kDa), β -laktoglobulin (18.4 kDa), tripsinojen (24 kDa), pepsin (34.7 kDa), ovalbumin (45 kDa), sığır serum albumin (66 kDa)

3.3.3 YPPO Enziminin Farklı Substratları için Optimum pH ve Sıcaklık Tayini

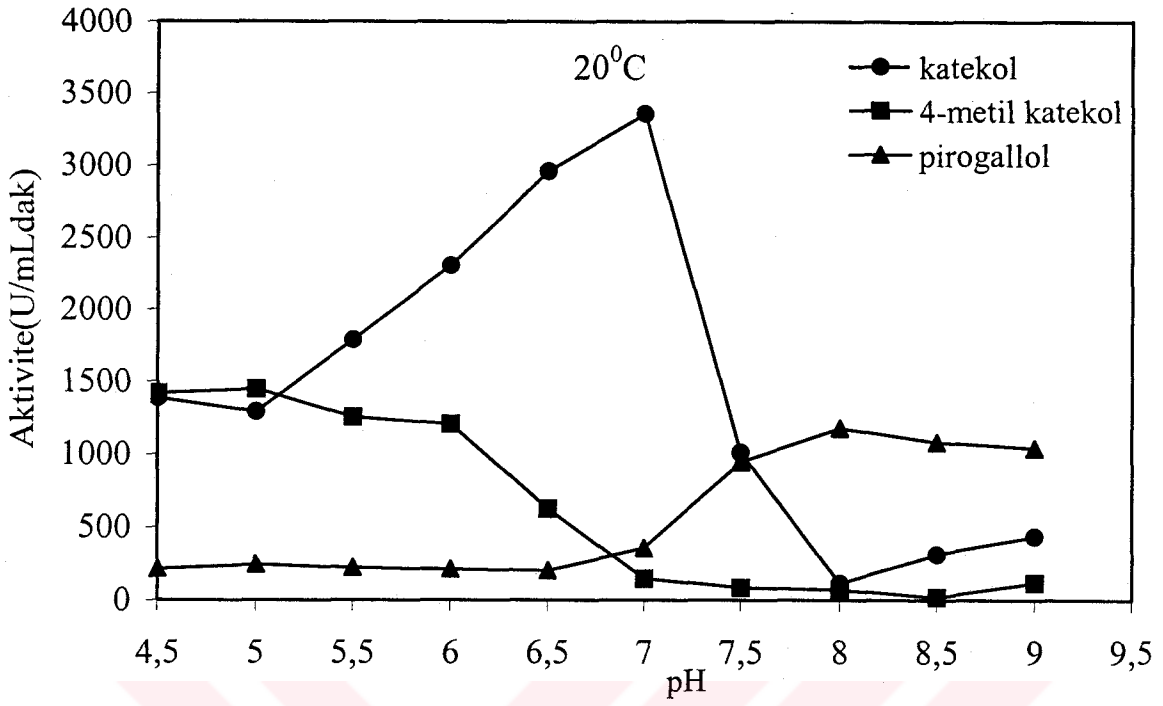
YPPO enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık ve pH değerlerini belirlemek amacı ile değişik pH değerlerinde (4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) farklı substratlar (katekol, 4-metil katekol, pirogallol) kullanılarak 20, 30, 35, 45, 55, 65 ve 75 °C'deki reaksiyon hızları spektrofotometrik yöntemle bölüm 2.2.7'de anlatıldığı gibi ayrı ayrı belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2-3.10 ve Şekil 3.12-3.18'de verildi.

Çizelge 3.2 YPPO enzimi için 20°C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorpsans, U, aktivite ve % aktivite değerleri

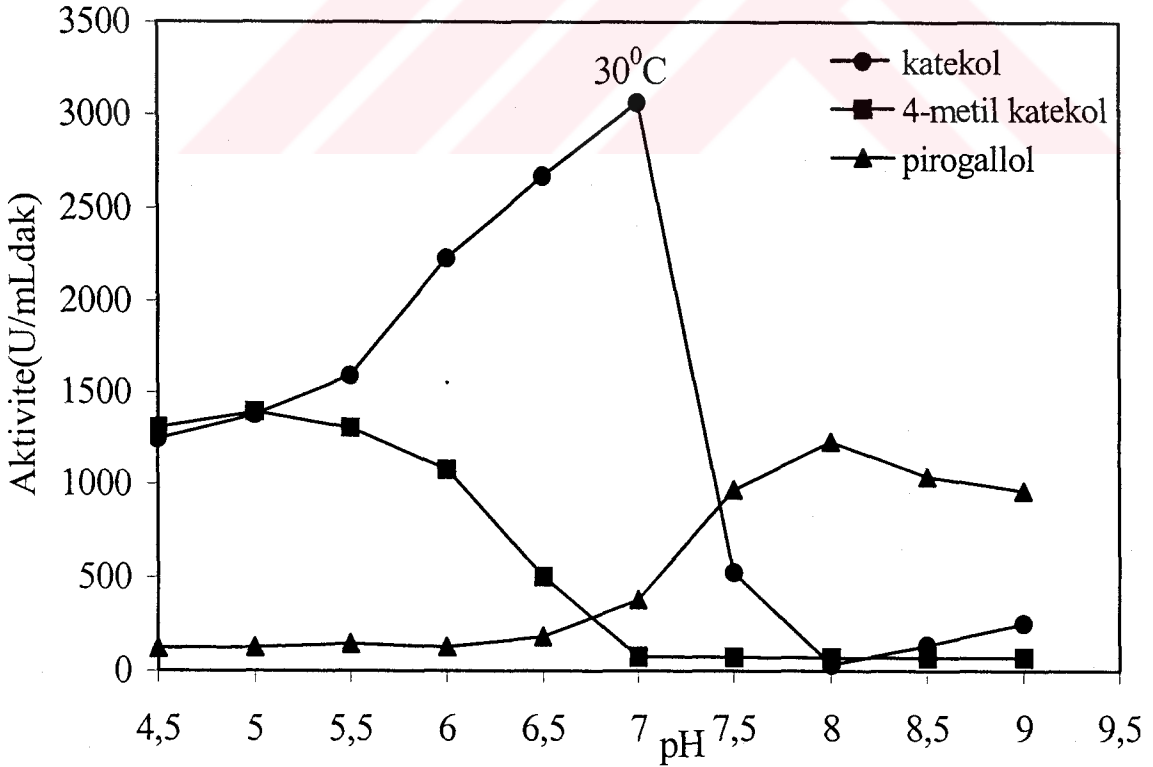
20 °C												
pH	katekol				4-metil katekol				pirogallol			
	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite
4.5	0.2768	276.8	1384	41.22	0.2833	283.3	1417	97.93	0.0427	42.7	214	18.21
5.0	0.2581	258.1	1291	38.45	0.2893	289.3	1447	100.00	0.0489	48.9	245	20.85
5.5	0.3576	357.6	1788	53.25	0.2508	250.8	1254	86.66	0.0443	44.3	222	18.89
6.0	0.4607	460.7	2304	68.61	0.2409	240.9	1205	83.28	0.0426	42.6	213	18.13
6.5	0.5920	592.0	2960	88.15	0.1249	124.9	625	43.19	0.0406	40.6	203	17.28
7.0	0.6716	671.6	3358	100.00	0.0294	29.4	147	10.16	0.0714	71.4	357	30.38
7.5	0.2019	201.9	1010	30.08	0.0168	16.8	84	5.81	0.1890	189.0	945	80.43
8.0	0.0228	22.8	114	3.40	0.0140	14.0	70	4.84	0.2349	234.9	1175	100.00
8.5	0.0629	62.9	315	9.38	0.0042	4.2	21	1.45	0.2164	216.4	1082	92.09
9.0	0.0871	87.1	436	12.98	0.0242	24.2	121	8.36	0.2082	208.2	1041	88.60

Çizelge 3.3 YPPO enzimi için 30°C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorpsans, U, aktivite ve % aktivite değerleri

30 °C														
katekol														
pH	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	4-metil katekol				pirogallol					
					ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite		
4.5	0.2487	248.7	1244	40.63	0.2611	261.1	1306	93.69	0.0235	23.5	118	9.61		
5.0	0.2754	275.4	1377	44.97	0.2788	278.8	1394	100.00	0.0246	24.6	123	10.02		
5.5	0.3178	317.8	1589	51.89	0.2608	260.8	1304	93.54	0.0285	28.5	143	11.64		
6.0	0.4458	445.8	2229	72.80	0.2156	215.6	1078	77.33	0.0249	24.9	125	10.18		
6.5	0.5331	533.1	2666	87.07	0.1002	100.2	501	35.94	0.0362	36.2	181	14.74		
7.0	0.6124	612.4	3062	100.00	0.0150	15.0	75	5.38	0.0755	75.5	378	30.78		
7.5	0.1043	104.3	522	17.05	0.0145	14.5	73	5.24	0.1935	193.5	968	78.83		
8.0	0.0062	6.2	31	1.01	0.0140	14.0	70	5.02	0.2456	245.6	1228	100.00		
8.5	0.0268	26.8	134	4.38	0.0142	14.2	71	5.09	0.2080	208.0	1040	84.69		
9.0	0.0500	50.0	250	8.16	0.0140	14.0	70	5.02	0.1924	192.4	962	78.34		



Şekil 3.12 YPPO enziminin 20 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği



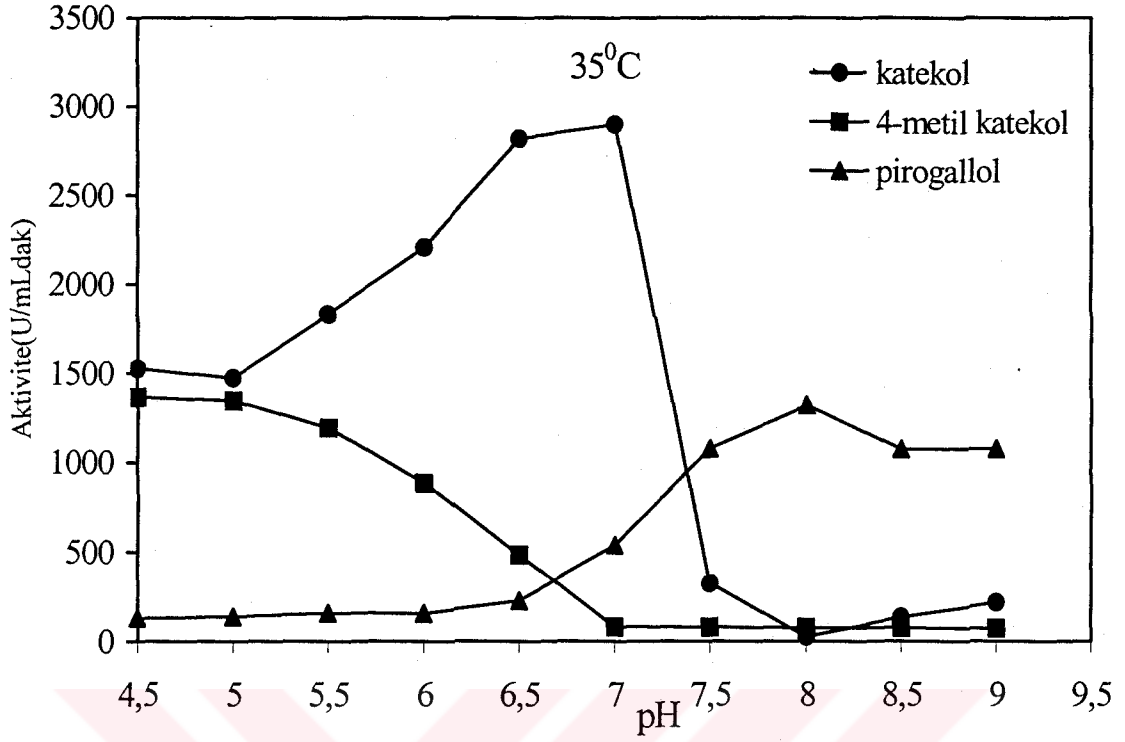
Şekil 3.13 YPPO enziminin 30 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği

Çizelge 3.4 YPPO enzimi için 35°C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorpsans, U, aktivite ve % aktivite değerleri

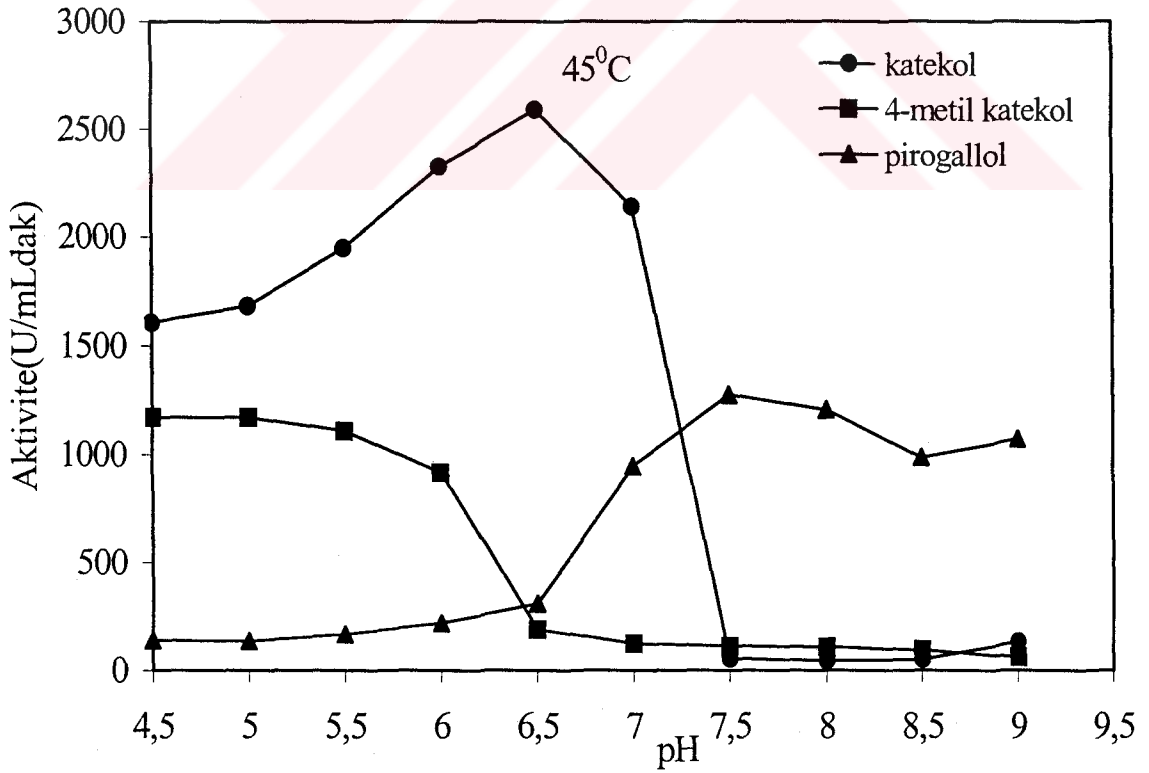
35°C																				
katekol																				
pH	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	4-metil katekol				pirogallol											
					ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite								
4.5	0.3052	305.2	1526	52.66	0.2734	273.4	1367	100.00	0.0257	25.7	129	9.78	0.2695	269.5	1348	98.61	0.0275	27.5	138	10.46
5.0	0.2948	294.8	1474	50.86	0.2389	238.9	1195	87.42	0.0316	31.6	158	11.98	0.1772	177.2	886	64.81	0.0309	30.9	155	11.75
5.5	0.3660	366.0	1830	63.15	0.0963	96.3	482	32.26	0.0456	45.6	228	17.29	0.0160	16.0	80	5.85	0.1073	107.3	537	40.71
6.0	0.4418	441.8	2209	76.22	0.0155	15.5	78	5.71	0.2156	215.6	1078	81.73	0.0150	15.0	75	5.49	0.2637	263.7	1319	100.00
6.5	0.5635	563.5	2818	97.24	0.0148	14.8	74	5.41	0.0145	14.5	73	5.34	0.0148	14.8	74	5.41	0.2148	214.8	1074	81.43
7.0	0.5796	579.6	2898	100.00	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34
7.5	0.0645	64.5	323	11.15	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34
8.0	0.0050	5.0	25	0.86	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34
8.5	0.0268	26.8	134	4.62	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34
9.0	0.0431	43.1	216	7.45	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34	0.0145	14.5	73	5.34

Çizelge 3.5 YPPO enzimi için 45°C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorpsans, U, aktivite ve % aktivite değerleri

45°C																
pH	katekol					4-metil katekol					pirogallol					
	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite
4.5	0.3213	321.3	1607	62.05	0.2345	234.5	1173	99.91	0.0279	27.9	140	10.97	0.0279	27.9	140	10.97
5.0	0.3366	336.6	1683	64.98	0.2348	234.8	1174	100.00	0.0271	27.1	136	10.66	0.0271	27.1	136	10.66
5.5	0.3898	389.8	1949	75.25	0.2218	221.8	1109	94.46	0.0333	33.3	167	13.09	0.0333	33.3	167	13.09
6.0	0.4649	464.9	2325	89.77	0.1833	183.3	917	78.11	0.0438	43.8	219	17.16	0.0438	43.8	219	17.16
6.5	0.5179	517.9	2590	100.00	0.0377	37.7	189	16.10	0.0618	61.8	309	24.22	0.0618	61.8	309	24.22
7.0	0.4279	427.9	2140	82.63	0.0248	24.8	124	10.56	0.1892	189.2	946	74.14	0.1892	189.2	946	74.14
7.5	0.0110	11.0	55	2.12	0.0224	22.4	112	9.54	0.2551	255.1	1276	100.00	0.2551	255.1	1276	100.00
8.0	0.0087	8.7	44	1.70	0.0216	21.6	108	9.20	0.2413	241.3	1207	94.59	0.2413	241.3	1207	94.59
8.5	0.0102	10.2	51	1.97	0.0188	18.8	94	8.01	0.1971	197.1	986	77.27	0.1971	197.1	986	77.27
9.0	0.0263	26.3	132	5.10	0.0124	12.4	62	5.28	0.2143	214.3	1072	84.01	0.2143	214.3	1072	84.01



Şekil 3.14 YPPO enziminin 35 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği



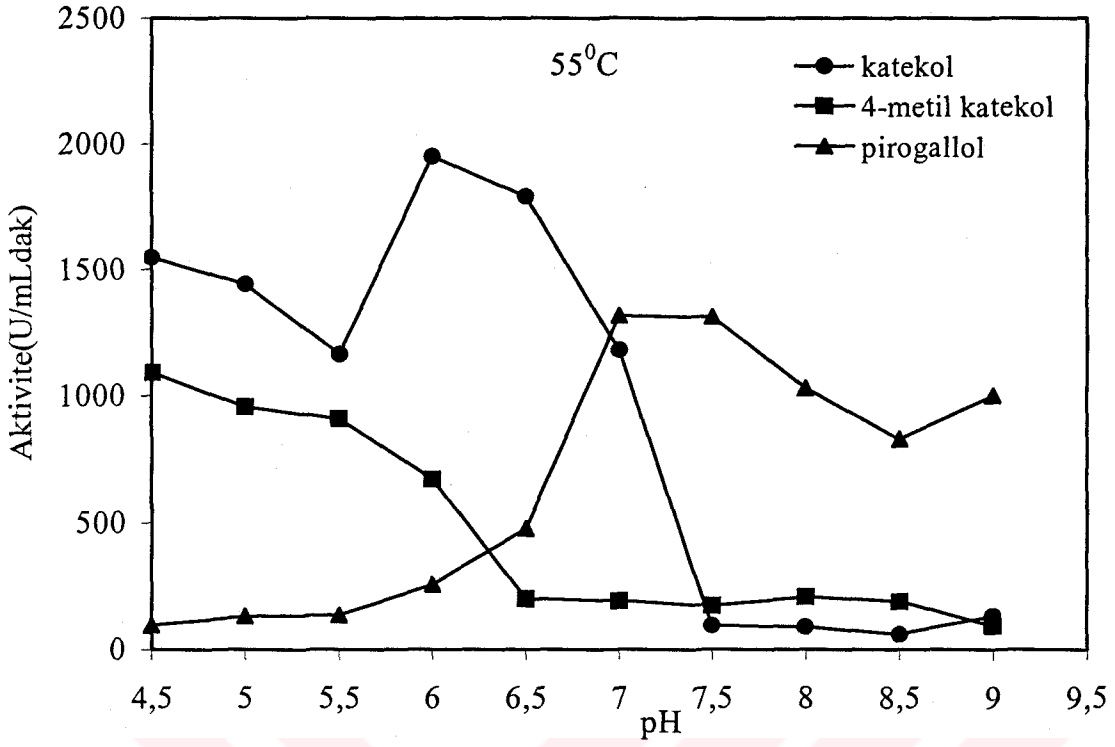
Şekil 3.15 YPPO enziminin 45 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği

Çizelge 3.6 YPPO enzimi için 55°C'de, üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorpsans, U, aktivite ve % aktivite değerleri

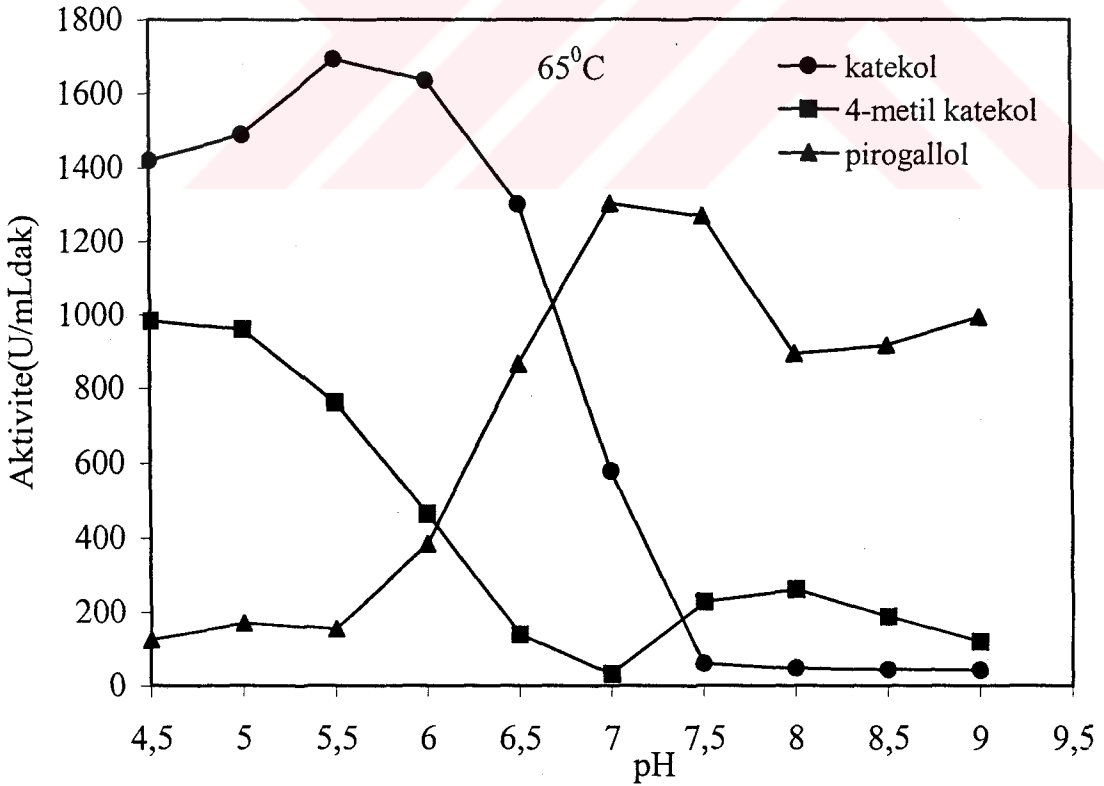
55°C													
pH	katekol				4-metil katekol				pirogallol				
	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	
4.5	0.3096	309.6	1548	79.38	0.2181	218.1	1091	100.00	0.0192	19.2	96	7.29	
5.0	0.2883	288.3	1442	73.95	0.1912	191.2	956	87.63	0.0263	26.3	132	10.03	
5.5	0.2323	232.3	1162	59.59	0.1817	181.7	909	83.32	0.0272	27.2	136	10.33	
6.0	0.3899	389.9	1950	100.00	0.1345	134.5	673	61.69	0.0515	51.5	258	19.60	
6.5	0.3579	357.9	1790	91.79	0.0404	40.4	202	18.52	0.0957	95.7	479	36.40	
7.0	0.2356	235.6	1178	60.41	0.0388	38.8	194	17.78	0.2631	263.1	1316	100.00	
7.5	0.0190	19.0	95	4.87	0.0348	34.8	174	15.95	0.2622	262.2	1311	99.62	
8.0	0.0180	18.0	90	4.62	0.0418	41.8	209	19.16	0.2056	205.6	1028	78.12	
8.5	0.0120	12.0	60	3.08	0.0381	38.1	191	17.51	0.1660	166.0	830	63.07	
9.0	0.0266	26.6	133	6.82	0.0183	18.3	92	8.43	0.1996	199.6	998	75.84	

Çizelge 3.7 YPPO enzimi için 65°C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorpsans, U, aktivite ve % aktivite değerleri

65°C																
pH	katekol					4-metil katekol					pirogallol					
	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite
4.5	0.2837	283.7	1419	83.82	0.1965	196.5	983	100.00	0.0250	25.0	125	9.60	0.0250	25.0	125	9.60
5.0	0.2977	297.7	1489	87.95	0.1920	192.0	960	97.66	0.0339	33.9	170	13.06	0.0339	33.9	170	13.06
5.5	0.3386	338.6	1693	100.00	0.1524	152.4	762	77.52	0.0307	30.7	154	11.83	0.0307	30.7	154	11.83
6.0	0.3269	326.9	1635	96.57	0.0930	93.0	465	47.30	0.0767	76.7	384	29.49	0.0767	76.7	384	29.49
6.5	0.2601	260.1	1301	76.85	0.0278	27.8	139	14.14	0.1731	173.1	866	66.51	0.1731	173.1	866	66.51
7.0	0.1156	115.6	578	34.14	0.0064	6.4	32	3.26	0.2603	260.3	1302	100.00	0.2603	260.3	1302	100.00
7.5	0.0118	11.8	59	3.48	0.0454	45.4	227	23.09	0.2535	253.5	1268	97.39	0.2535	253.5	1268	97.39
8.0	0.0094	9.4	47	2.78	0.0524	52.4	262	26.65	0.1787	178.7	894	68.66	0.1787	178.7	894	68.66
8.5	0.0086	8.6	43	2.54	0.0374	37.4	187	19.02	0.1834	183.4	917	70.43	0.1834	183.4	917	70.43
9.0	0.0084	8.4	42	2.48	0.0240	24.0	120	12.21	0.1986	198.6	993	76.27	0.1986	198.6	993	76.27



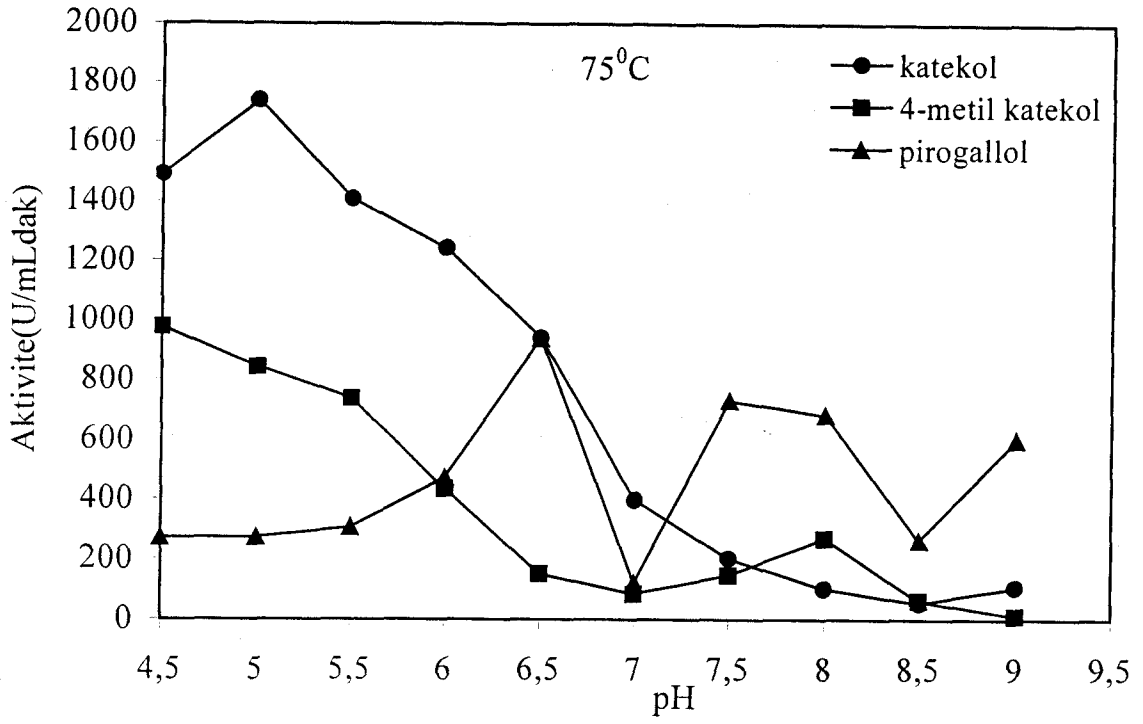
Şekil 3.16 YPPO enziminin 55 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği



Şekil 3.17 YPPO enziminin 65 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği

Çizelge 3.8 YPPO enzimi için 75°C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorpsans, U, aktivite ve % aktivite değerleri

75°C																
pH	katekol				4-metil katekol				pirogallol							
	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite
4.5	0.2982	298.2	1491	85.74	0.1954	195.4	977	100.00	0.0541	54.1	271	28.89	0.0541	54.1	271	28.89
5.0	0.3477	347.7	1739	100.00	0.1683	168.3	842	86.18	0.0544	54.4	272	29.00	0.0544	54.4	272	29.00
5.5	0.2819	281.9	1410	81.08	0.1474	147.4	737	75.44	0.0611	61.1	306	32.62	0.0611	61.1	306	32.62
6.0	0.2483	248.3	1242	71.42	0.0867	86.7	434	44.42	0.0946	94.6	473	50.43	0.0946	94.6	473	50.43
6.5	0.1881	188.1	941	54.11	0.0302	30.2	151	15.46	0.1875	187.5	938	100.00	0.1875	187.5	938	100.00
7.0	0.0795	79.5	398	22.89	0.0170	17.0	85	87.00	0.2420	242.0	121	12.90	0.2420	242.0	121	12.90
7.5	0.0404	40.4	202	11.62	0.0293	29.3	147	15.05	0.1459	145.9	730	77.83	0.1459	145.9	730	77.83
8.0	0.0203	20.3	102	5.87	0.0538	53.8	269	27.53	0.1364	136.4	682	72.71	0.1364	136.4	682	72.71
8.5	0.0109	10.9	55	3.16	0.0126	12.6	63	6.45	0.0526	52.6	263	28.04	0.0526	52.6	263	28.04
9.0	0.0214	21.4	107	6.15	0.0024	2.4	12	1.23	0.1200	120.0	600	63.97	0.1200	120.0	600	63.97



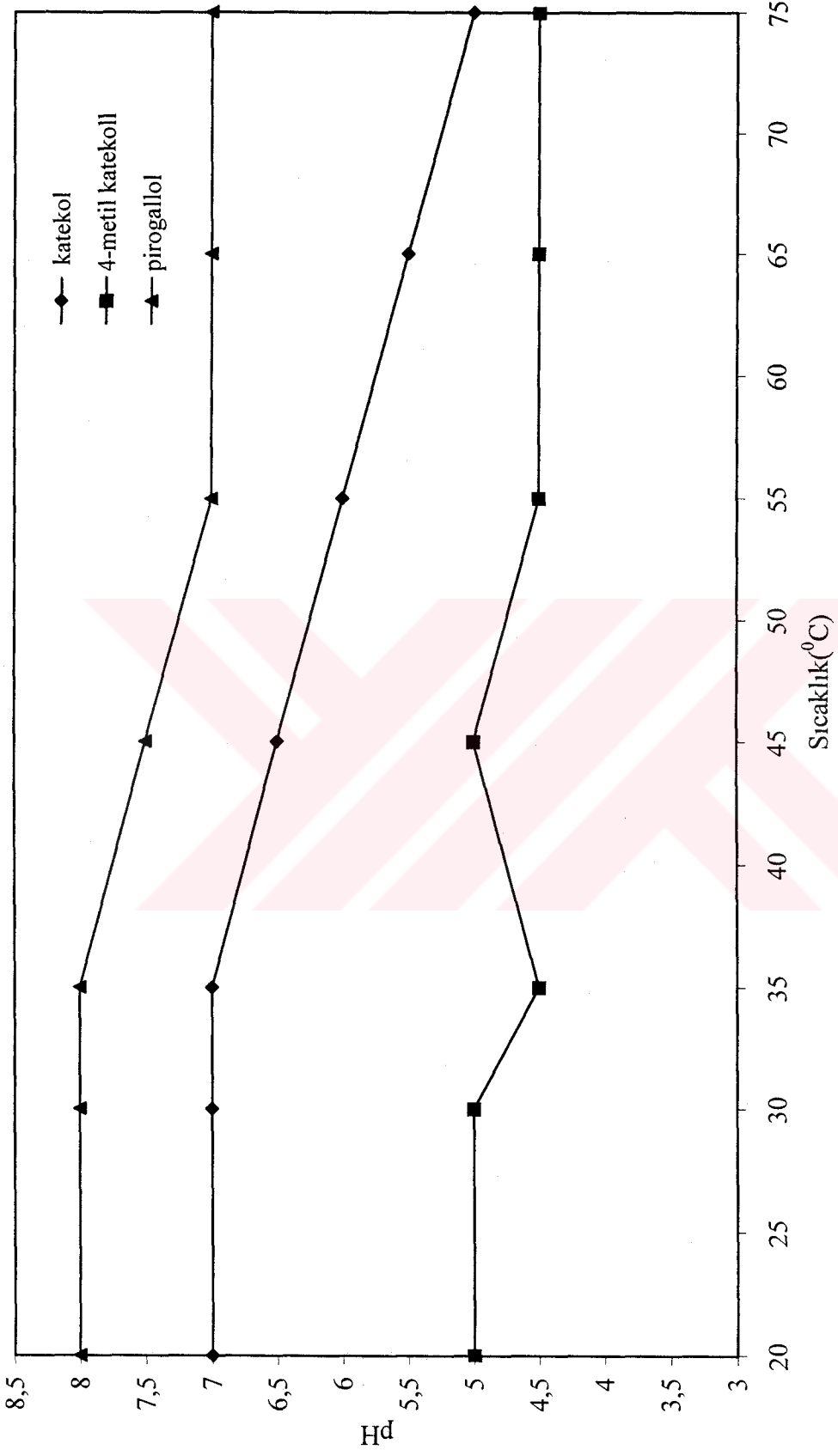
Şekil 3.18 YPPO enziminin 75⁰C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği

Çizelge 3.9 YPPO enziminin üç ayrı substratı için değişik sıcaklıklardaki optimum pH değerleri

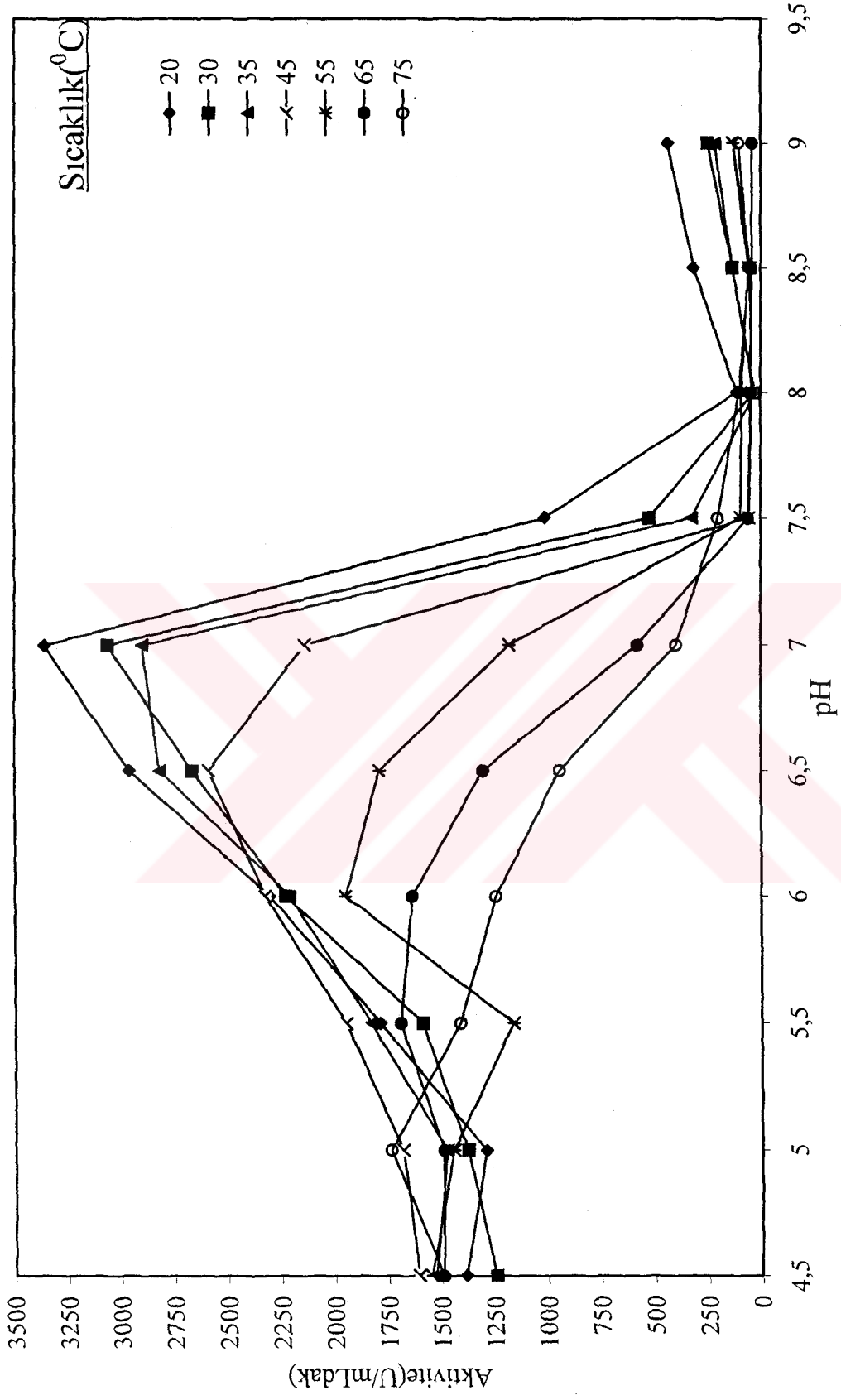
Sıcaklık (°C)	Substrat		
	katekol Optimum pH	4-metil katekol Optimum pH	pirogallol Optimum pH
20	7.0	5.0	8.0
30	7.0	5.0	8.0
35	7.0	4.5	8.0
45	6.5	5.0	7.5
55	6.0	4.5	7.0
65	5.5	4.5	7.0
75	5.0	4.5	7.0

Çizelge 3.10 YPPO enziminin üç ayrı substratı için optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri

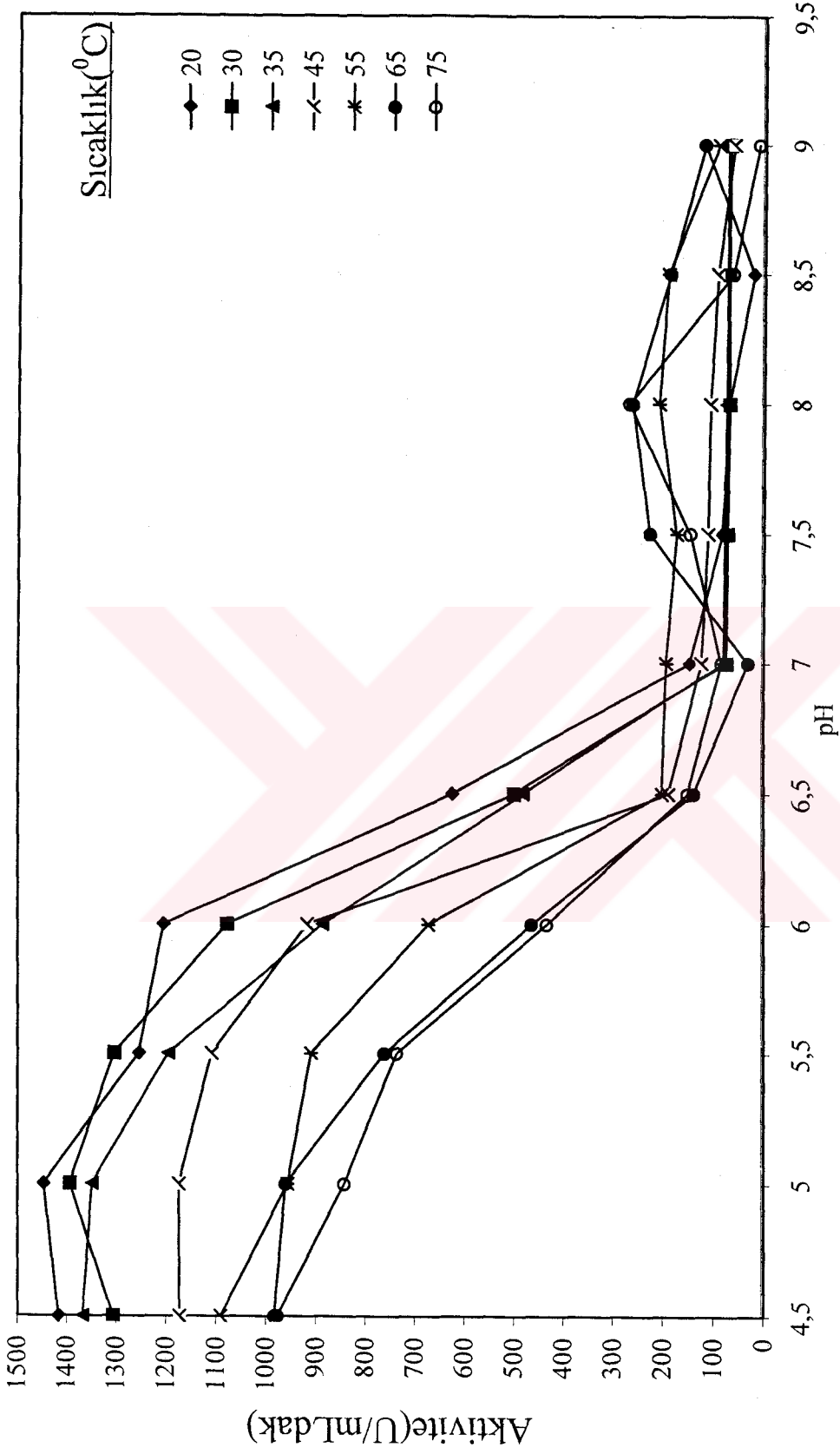
Substrat	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)	Aktivite(U/mLdak)
katekol	7.0	20	3358
4-metil katekol	5.0	20	1447
pirogallol	8.0	35	1319



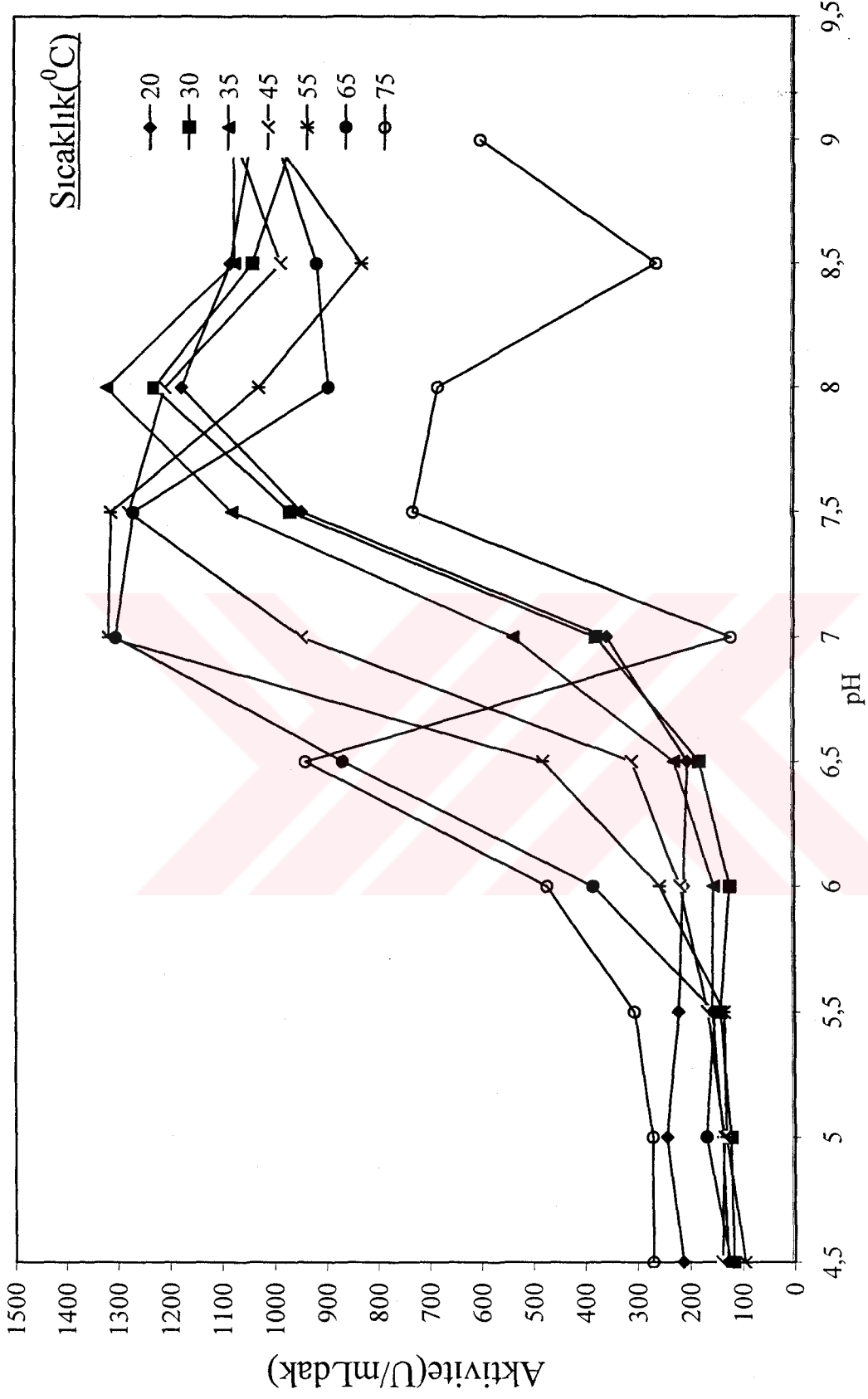
Şekil 3.19 YPPO enziminin üç farklı substratı için değişik sıcaklıklardaki optimum pH değişimini gösteren grafik



Şekil 3.20 YPPO enziminin katekol substratı için değişik sıcaklıklarda pH'ya bağı aktivite değişimini gösteren grafik



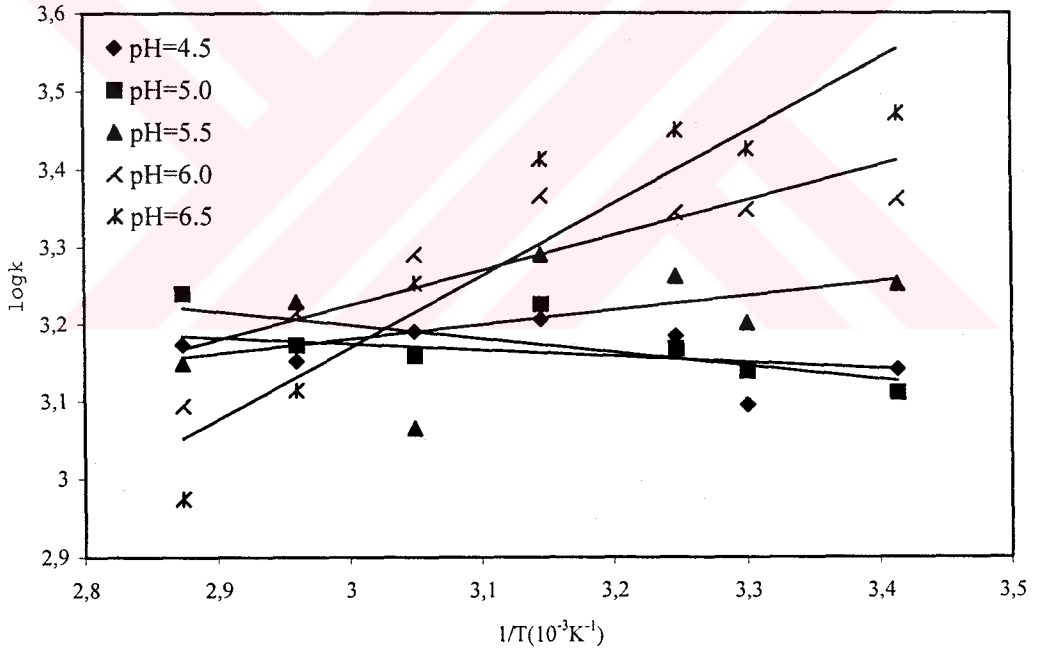
Şekil 3.21 YPPO enziminin 4-metil katekol substratı için değişik sıcaklıklarda pH'ya bağlı aktivite değişimini gösteren grafik



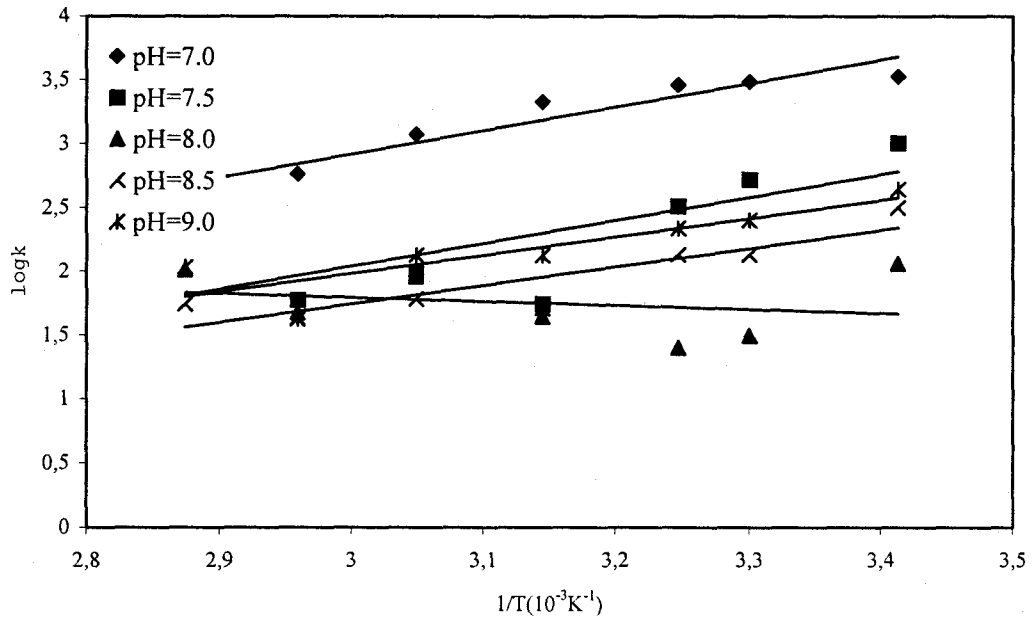
Şekil 3.22 YPPO enziminin pirogallol substratı için değişik sıcaklıklarda pH'ya bağlı aktivite değişimini gösteren grafik

3.3.4 YPPO Enziminin pH'ya Bağımlı Aktivasyon Enerjisinin Değişimi

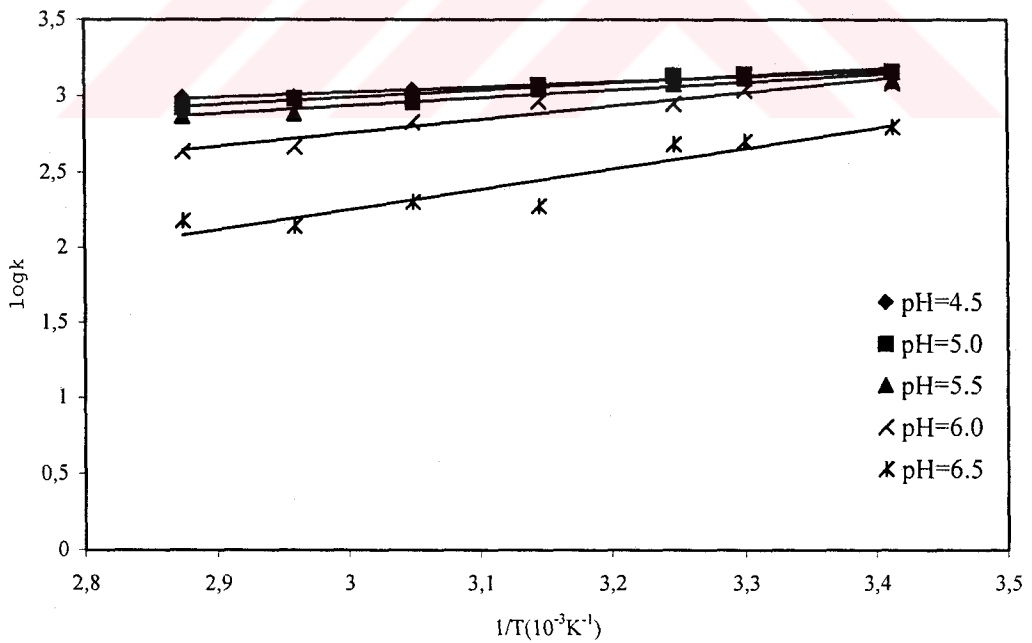
YPPO enziminin aktivasyon enerjisini belirlemek için her bir pH'da ve sıcaklıklarda yapılan çalışmaların aktivite değerlerinden yararlanılarak her bir substratın enzimle olan reaksiyonu için aktivasyon enerjileri bölüm 2.2.8.2'de anlatıldığı gibi hesaplandı. Yapılan optimum pH ve sıcaklık çalışmalarından elde edilen aktivite değerlerinin (U/mLdak) logaritması, reaksiyon sıcaklıklarının ($^{\circ}$ K) tersine ($1/T$) karşı grafiği çizildi. Arrhenius denkleminde yararlanılarak grafiklerin eğiminden ($-E_a/2.303R$) aktivasyon enerjileri hesaplandı. Çizilen grafikler Şekil 3.23-3.28'de, elde edilen aktivasyon enerji değerleri de Çizelge 3.11'de verildi.



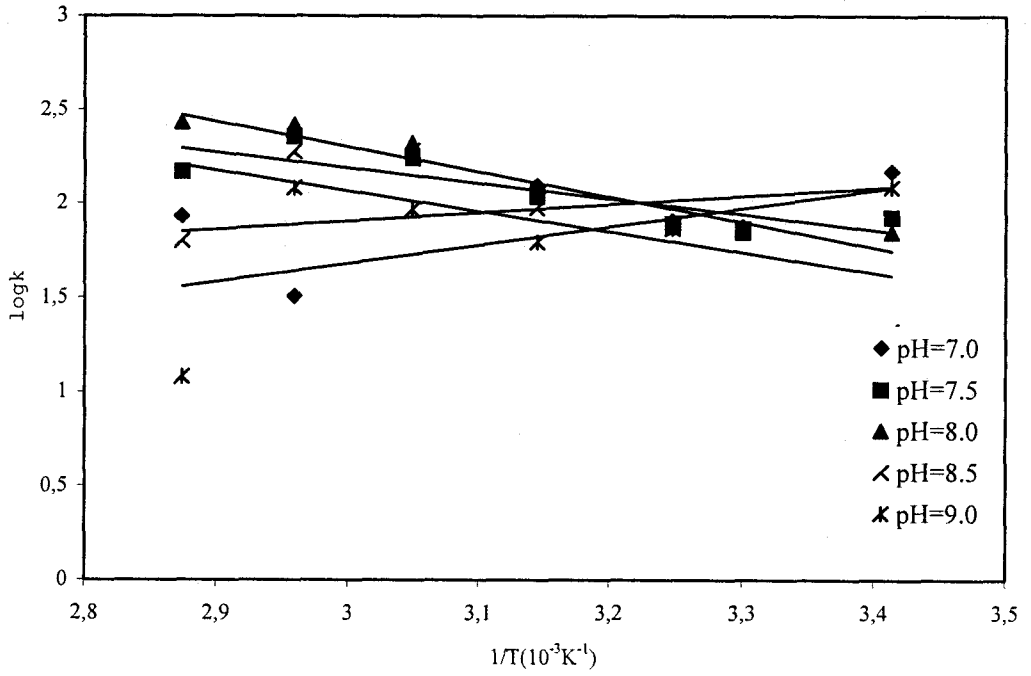
Şekil 3.23 YPPO enzimi için 10 mM katekol substratı ile pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5'de elde edilen logk - ($1/T$) grafiği



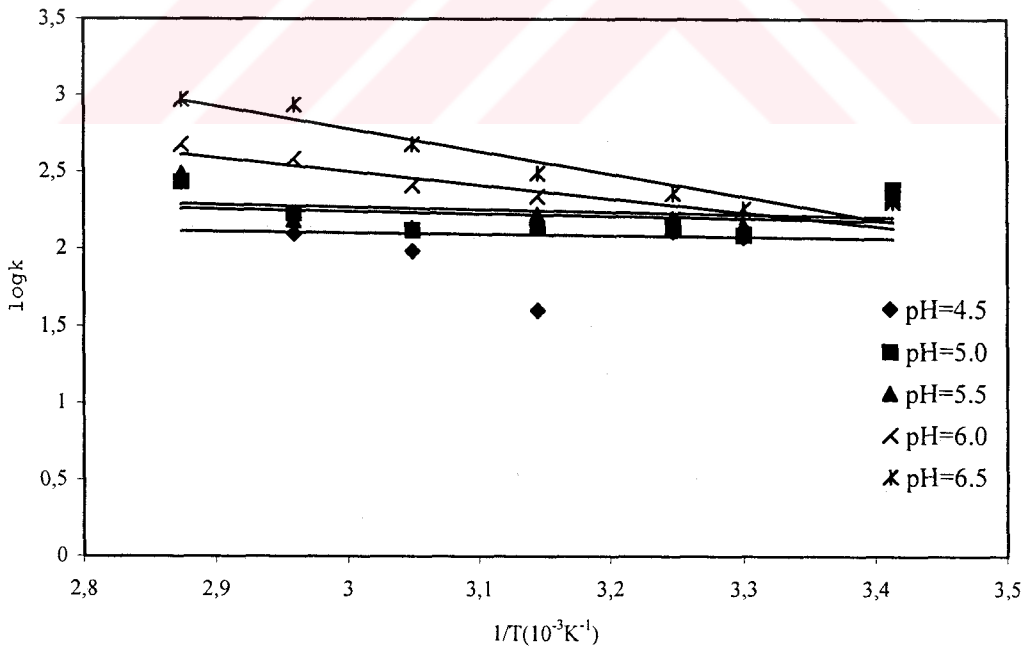
Şekil 3.24 YPPO enzimi için 10 mM katekol substratı ile pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 'da elde edilen logk - (1/T) grafiği



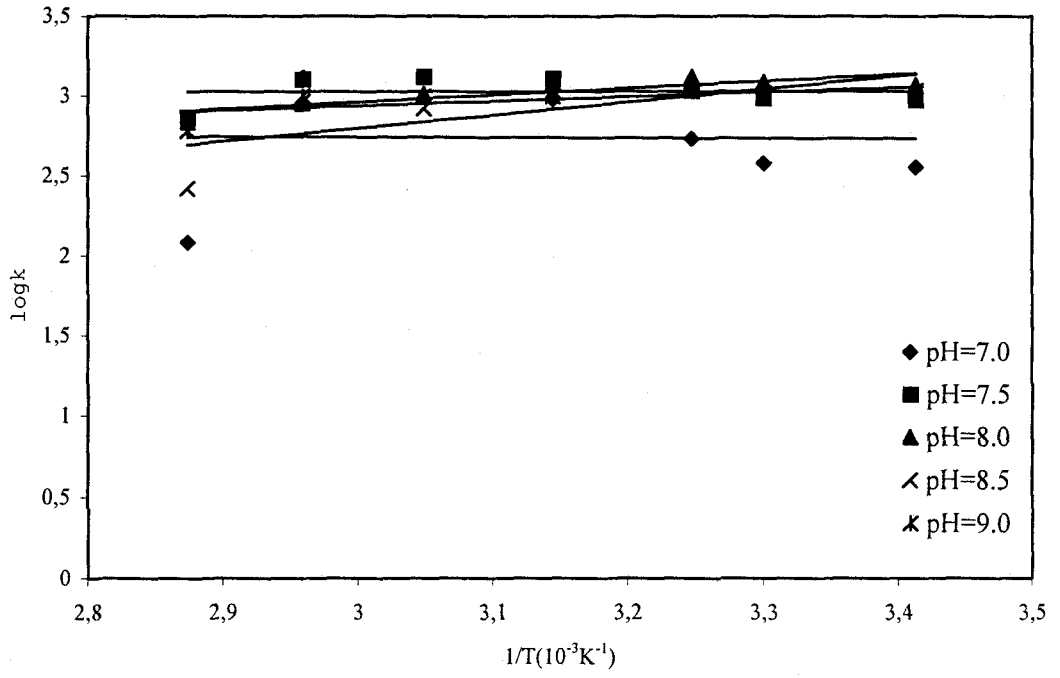
Şekil 3.25 YPPO enzimi için 10 mM 4-metil katekol substratı ile pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5'de elde edilen logk - (1/T) grafiği



Şekil 3.26 YPPO enzimi için 10 mM 4-metil katekol substratı ile pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği



Şekil 3.27 YPPO enzimi için 10 mM pirogallol substratı ile pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği



Şekil 3.28 YPPO enzimi için 10 mM pirogallol substratı ile pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 'da elde edilen logk – (1/T) grafiği

Çizelge 3.11 YPPO enzimi için değişik pH'larda üç farklı substratı için elde edilen aktivasyon enerjileri

pH	Substrat					
	katekol		4-metil katekol		pirogallol	
	Eğim ($-E_A/2.303R$)	Aktivasyon Enerjisi (kal mol^{-1})	Eğim ($-E_A/2.303R$)	Aktivasyon Enerjisi (kal mol^{-1})	Eğim ($-E_A/2.303R$)	Aktivasyon Enerjisi (kal mol^{-1})
4.5	-78.6	359.7	334.2	-1529.3	-90.5	414.1
5.0	-175.4	802.6	472.8	-2163.6	-150.6	689.2
5.5	188.0	-860.3	510.5	-2336.1	-158.5	725.3
6.0	452.1	-2068.8	872.3	-3991.7	887.6	-4061.7
6.5	931.6	-4263.1	1341.6	-6139.2	-1469.9	6726.4
7.0	1854.2	-8484.9	439.5	-2011.2	-20.6	94.3
7.5	1801.4	-8243.3	-829.3	3794.9	8.4	-38.4
8.0	-309.5	1416.3	-1344.0	6150.2	440.4	-2015.3
8.5	1452.9	-6648.6	-1091.3	4993.9	825.6	-3778.0
9.0	1443.4	-6605.1	973.2	-4453.4	292.0	-1336.2

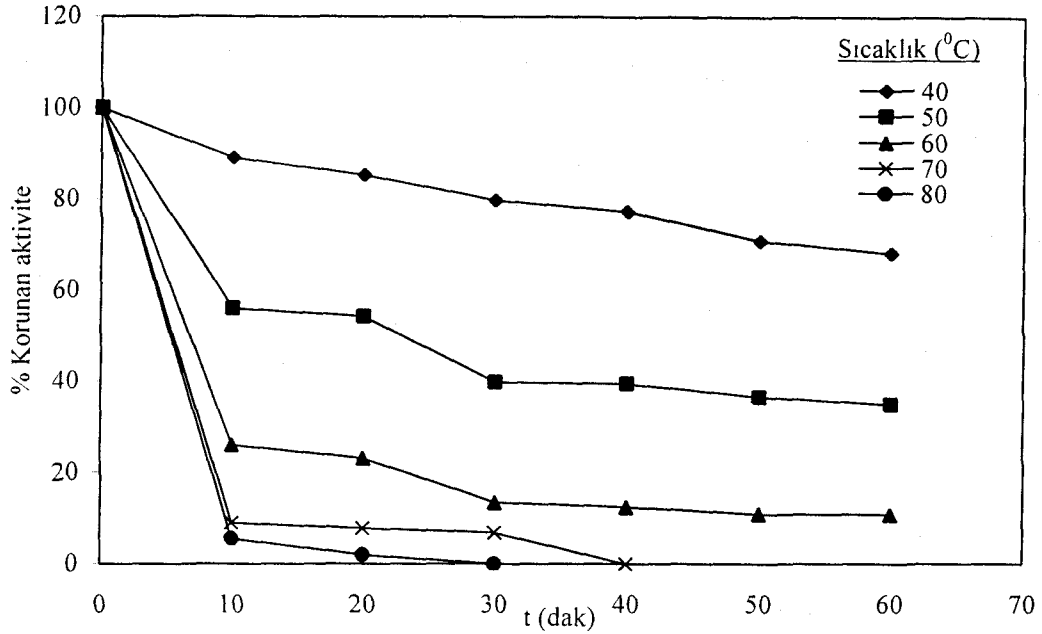
Çizelge 3.12 YPPO enziminin denatürasyon çalışmasının sonuçları

Bekleme Süresi(dak)	Sıcaklık											
	40 °C		50 °C		60 °C		70 °C		80 °C			
	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite
0	0.5576	100	0.5576	100	0.5576	100	0.5576	100	0.5576	100	0.5576	100
10	0.4972	89.17	0.3127	56.08	0.1448	25.97	0.0504	9.04	0.0309	5.54	0.0309	5.54
20	0.4760	85.37	0.3027	54.29	0.1286	23.06	0.0436	7.82	0.0111	1.99	0.0111	1.99
30	0.4448	79.77	0.2218	39.78	0.0748	13.41	-	-	-	-	-	-
40	0.4309	77.28	0.2198	39.42	0.0693	12.43	-	-	-	-	-	-
50	0.3952	70.88	0.2037	36.53	0.0611	10.96	-	-	-	-	-	-
60	0.3803	68.20	0.1943	34.85	0.0601	10.78	-	-	-	-	-	-

3.3.5 YPPO Enziminin Sıcaklığa Bağımlı Stabilité Özelliğinin Araştırılması

YPPO enziminin sıcaklığa bağımlı denatürasyon özelliğini belirlemek amacıyla; 40, 50, 60, 70 ve 80 °C'lerde 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakikalardaki bekleme süreleri sonunda aktiviteler saptandı. Elde edilen değerler % aktiviteye dönüştürüldü (Çizelge 3.12). Zamana karşı % aktivite grafiğı çizildi (Şekil 3.29).





Şekil 3.29 YPPO enziminin inkübasyon süresine bağımlı koruduğu aktivite değişimi

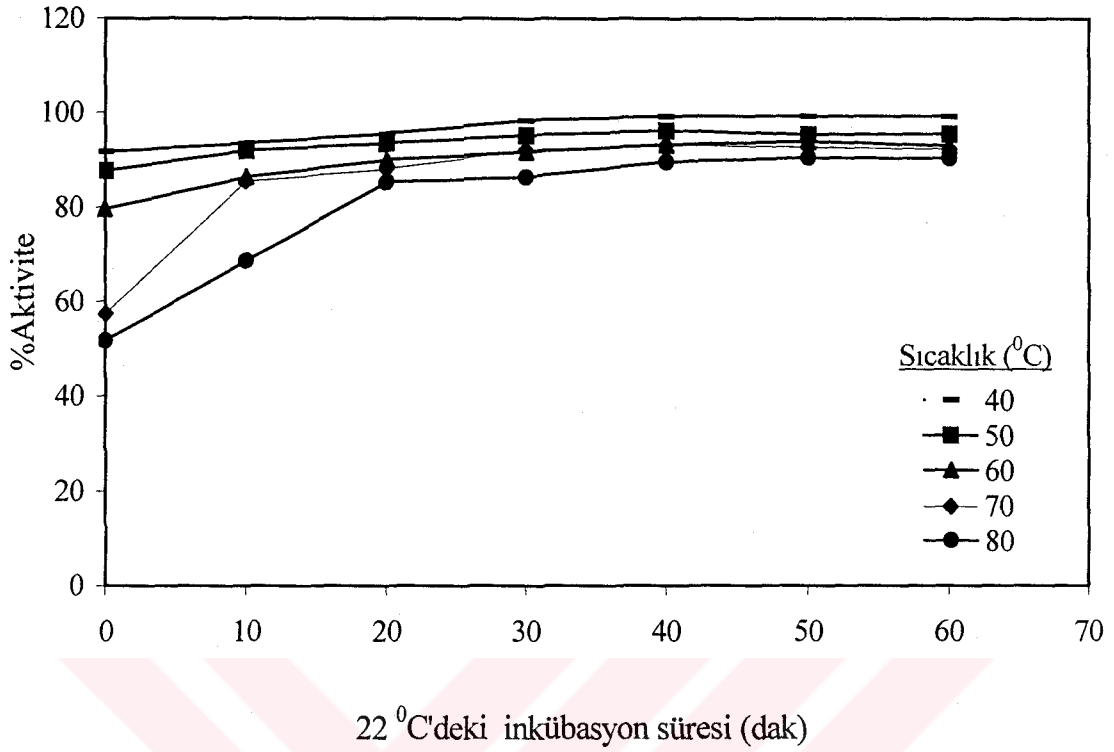
3.3.6 YPPO Enziminin Sıcaklığa Bağımlı Renatürasyon Özelliğinin Araştırılması

YPPO enziminin sıcaklığa bağımlı renatürasyon özelliğinin araştırılması işleminde önce enzimin optimum şartlarda katekol substratı ile aktivitesi ölçüldü ve bu değer % 100 aktivite değeri olarak alındı. 40, 50, 60, 70 ve 80 °C'lerde enzim çözeltisi 1 saat süre ile inkübe edildi. Çalışılan bütün sıcaklıklarda, 1 saatin sonunda enzim çözeltisinin sıcaklığı 22 °C'ye düşürüldü ve bu sıcaklıkta 10, 20, 30, 40, 50 ve 60'ıncı dakikalarda aktiviteler belirlendi. Elde edilen aktivite değerleri % aktiviteye dönüştürüldü (Çizelge 3.13). % Aktiviteye karşı 22 °C'deki inkübasyon süresi grafiği çizildi (Şekil 3.30).

Çizelge 3.13 YPPO enziminin renatürasyon çalışmasının sonuçları

22 °C'de bekleme süresi(dak)	Sıcaklık											
	40 °C		50 °C		60 °C		70 °C		80 °C		% Aktivite	% Aktivite
	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite		
0	0.5209	91.68	0.4984	87.72	0.4524	79.62	0.3259	57.36	0.2933	51.62		
10	0.5312	93.49	0.5222	91.90	0.4908	86.38	0.4856	85.46	0.3897	68.59		
20	0.5426	95.49	0.5311	93.47	0.5113	89.99	0.5003	88.05	0.4845	85.27		
30	0.5590	98.38	0.5410	95.21	0.5212	91.73	0.5231	92.06	0.4908	86.38		
40	0.5638	99.23	0.5468	96.23	0.5298	93.24	0.5289	93.08	0.5089	89.56		
50	0.5640	99.26	0.5417	95.34	0.5336	93.92	0.5268	92.71	0.5144	90.53		
60	0.5639	99.24	0.5425	95.48	0.5285	93.01	0.5245	92.31	0.5136	90.39		

Not:Deneye başlamadan önce 420 nm. 22 C' de aktivite 0.5682 olarak bulundu ve %aktivite değerleri bu değere göre hesaplandı.



Şekil 3.30 YPPO enziminin sıcaklığının çalışılan sıcaklıktan 22 °C'ye düşürülmesi üzerine, 10 mM katekol substratı kullanarak, elde edilen inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiği

3.3.7 YPPO Enziminin Farklı Substratları İçin Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla, optimum şartlarda katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratlarının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı. 420 nm'de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/mLdak) olarak alındı.

$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak (Çizelge 3.14-3.16) her bir substrat için Linewear-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.31-3.33). K_M ve V_{max} değerleri grafiklerden yararlanarak doğru denklemleri kullanılarak bulundu. Bulunan K_M , V_{max} ve V_{max}/K_M değerleri Çizelge 3.17'de verildi.

Çizelge 3.14 YPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

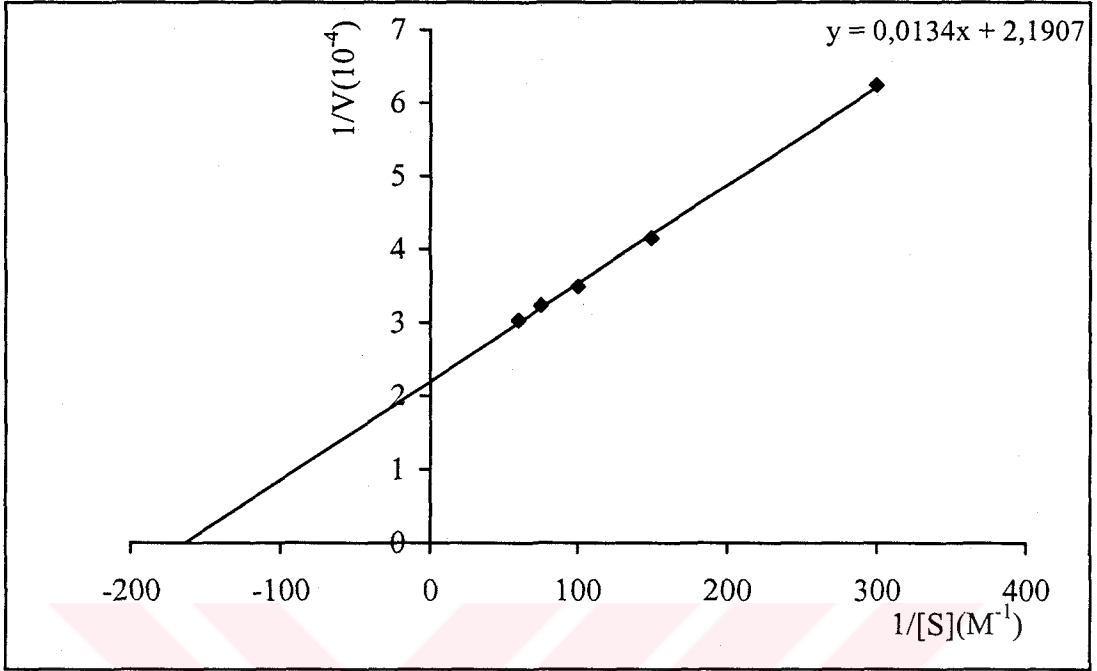
0.2 M Na-fosfat tamponu (mL)	Enzim çözeltisi hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2.7	0.2	0.1	3	3.33	0.3208	320.8	1604	6.234	300
2.6		0.2		6.67	0.4823	482.3	2412	4.146	150
2.5		0.3		10.00	0.5732	573.2	286.6	3.489	100
2.4		0.4		13.33	0.6190	619.0	3095	3.231	75
2.3		0.5		16.67	0.6612	661.2	3306	3.029	60

Çizelge 3.15 YPPO enziminin, 4-metil katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

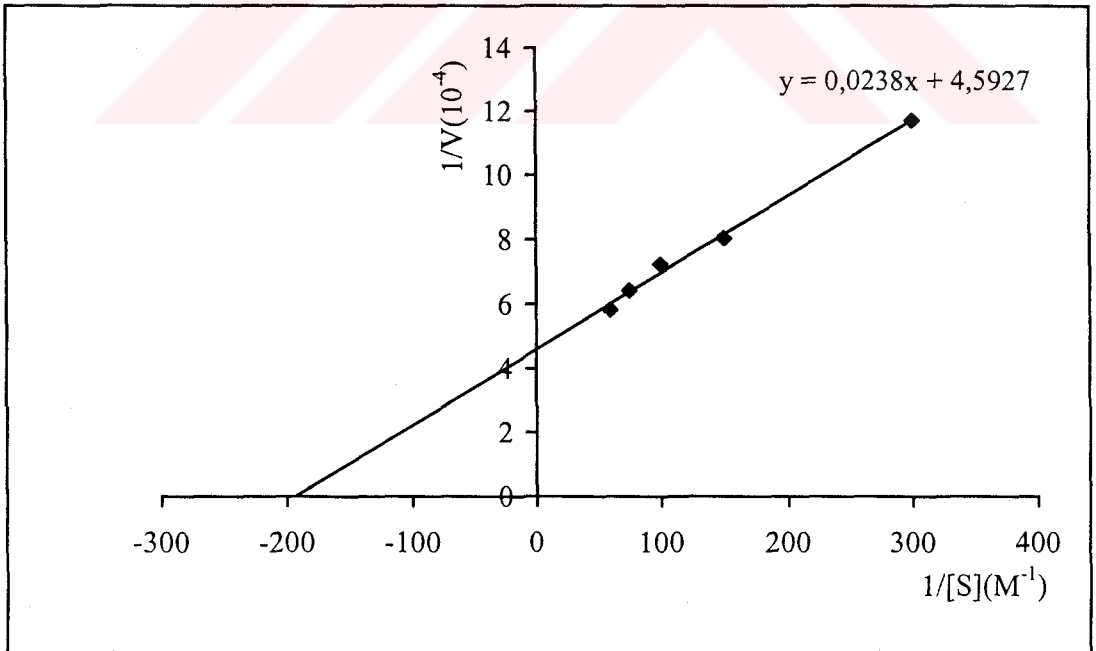
0.2 M Na-fosfat tamponu (mL)	Enzim çözeltisi hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2.7	0.2	0.1	3	3.33	0.1706	170.6	853	11.720	300
2.6		0.2		6.67	0.2488	248.8	1244	8.039	150
2.5		0.3		10.00	0.2766	276.6	1383	7.231	100
2.4		0.4		13.33	0.3116	311.6	1558	6.418	75
2.3		0.5		16.67	0.3428	342.8	1714	5.834	60

Çizelge 3.16 YPPO enziminin, pirogallol substratı kullanılarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

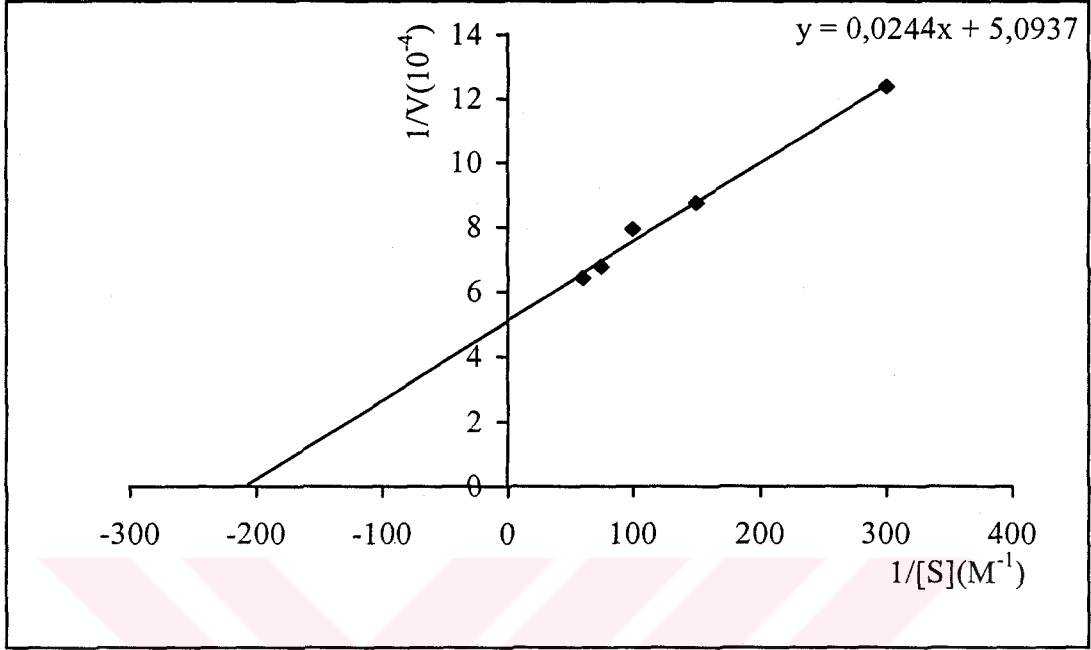
0.2 M Tris tamponu (mL)	Enzim çözeltisi hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2.7	0.2	0.1	3	3.33	0.1616	161.6	808	12.380	300
2.6		0.2		6.67	0.2288	228.8	1144	8.741	150
2.5		0.3		10.00	0.2526	252.6	1263	7.918	100
2.4		0.4		13.33	0.2955	295.5	1478	6.766	75
2.3		0.5		16.67	0.3121	312.1	1561	6.406	60



Şekil 3.31 YPPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.32 YPPO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.33 YPPO enzimi için pirogallol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.17 YPPO enziminin için üç farklı substratı için K_M ve V_{max} değerleri

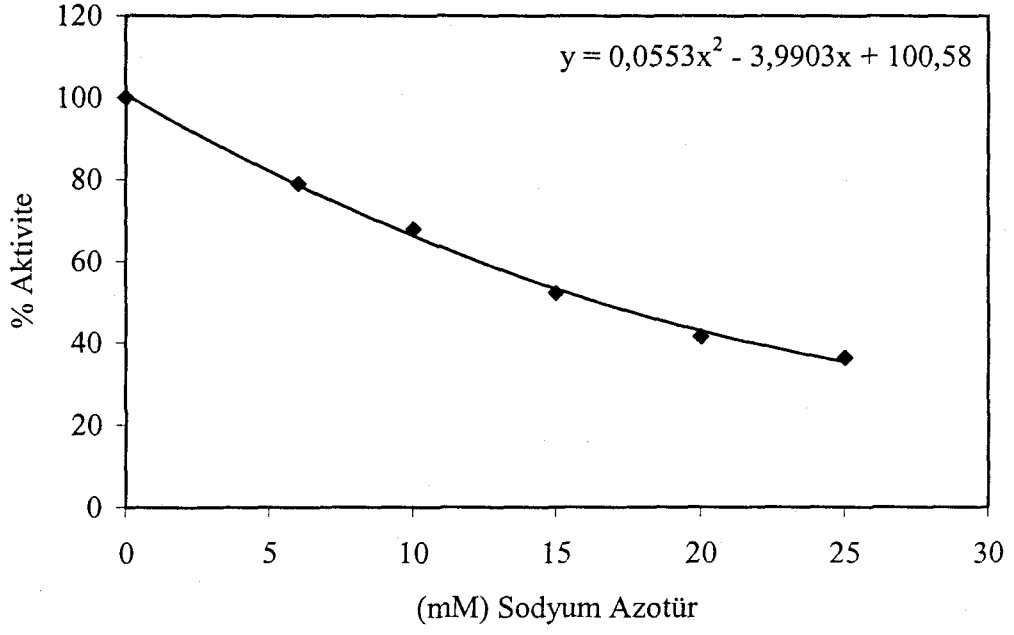
Substrat	$K_M(mM)$	$V_{max}(U/mLdak)$	V_{max}/ K_M
Katekol	6.12	4564.75	745.9×10^3
4-metil katekol	5.18	2177.37	420.3×10^3
pirogallol	4.79	1963.21	409.9×10^3

3.3.8 YPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin I_{50} Değerlerinin Bulunması

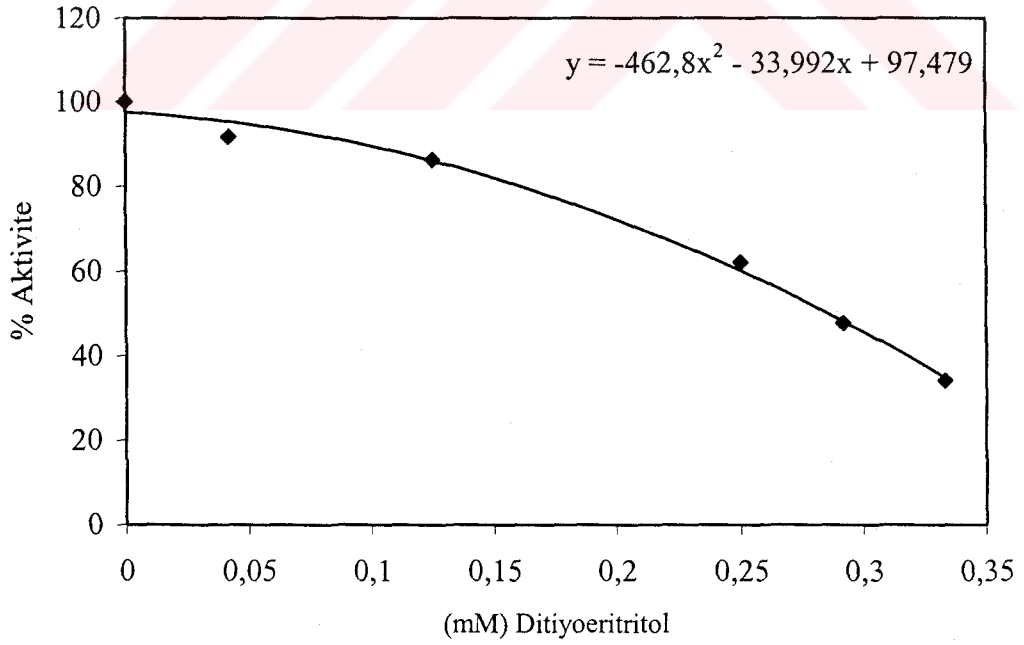
Bu çalışmamızda kullandığımız inhibitörlerin I_{50} değerlerini bulmak için, optimum şartlarda katekol substratının 10 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi olarak 0.1 M katekol hazırlandı ve her ölçümde 0.3 mL alındı. İnhibitör çözeltilerinden ise değişen hacimlerde alınarak toplam 3 mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer % 100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0.2 mL enzim çözeltisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 2.8 mL tampon + substrat + inhibitör çözeltisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm'de bir dakikada absorbansta meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorban değerlerinden % aktiviteler hesaplandı (Çizelge 3.18-3.24). % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 3.34-3.47). (I=küvetteki 3 mL hacim içerisinde bulunan inhibitör konsantrasyonudur) .Bu grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için I_{50} değerleri hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 3.25'de verildi.

Çizelge 3.18 YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sodyum azid ve ditiyoeritritol'ün, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tamponu (mL)	Inhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	Inhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (mM)	Δ OD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
2.50	<i>Sodyum azid</i>	200	300	-	-	0.5906	590.6	2953	100
2.47				30	6	0.4665	466.5	2332.5	78.99
2.45				50	10	0.4007	400.7	2000.3	67.85
2.43				75	15	0.3083	308.3	1541.5	52.20
2.40				100	20	0.2450	245.0	1225	41.48
2.37				125	25	0.2147	214.7	1073.5	36.35
2.50	<i>Ditiyoeritritol</i>	200	300	-	-	0.5782	578.2	2891	100
2.47				25	0.042	0.5298	529.8	2649	91.63
2.43				75	0.125	0.4989	498.9	2494.5	86.29
2.35				150	0.250	0.3587	358.7	1793.5	62.04
2.33				175	0.292	0.2758	275.8	1379	47.70
2.30				200	0.333	0.1968	196.8	984	34.04



Şekil 3.34 YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda sodyum azid için % aktivite-[I] grafiği

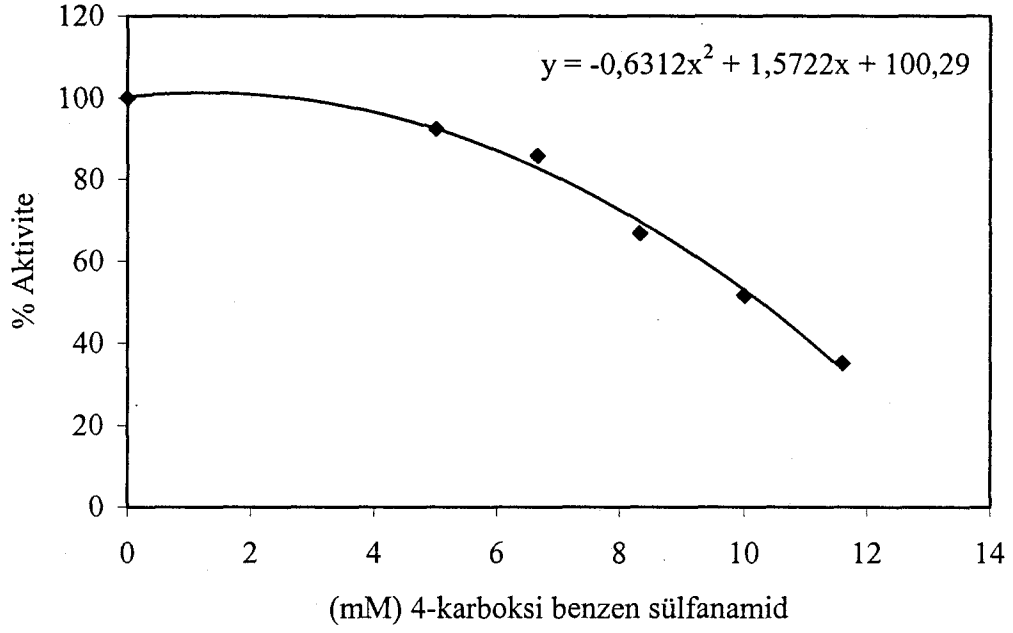


Şekil 3.35 YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda ditiyoeritritol için % aktivite-[I] grafiği

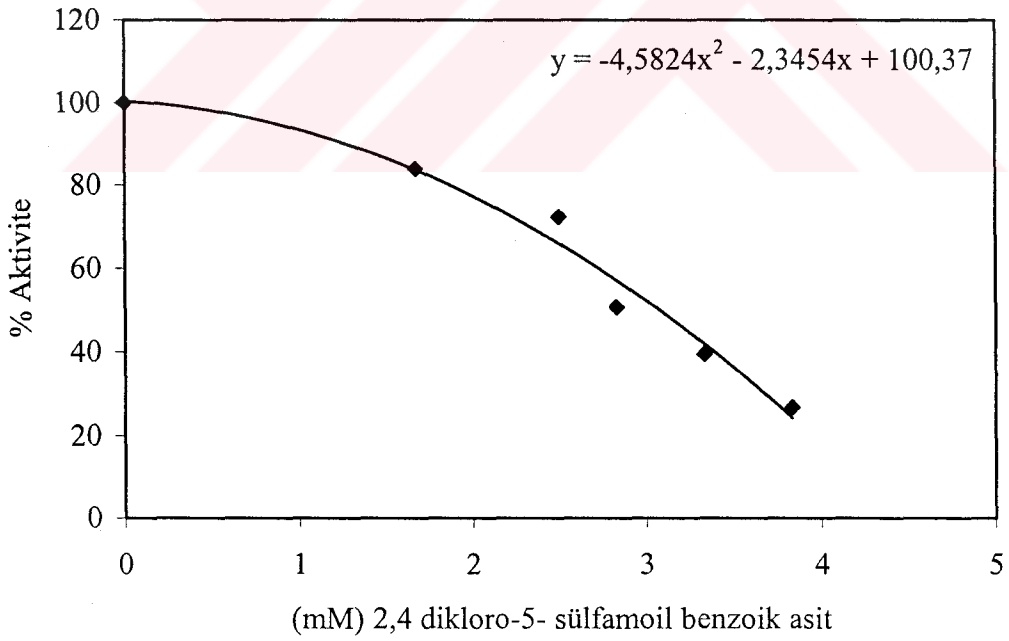
Çizelge 3.19 YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 4-karboksi benzen sülfanamid ve 2,4 dikloro-5-sülfamoil benzoik asidin,

I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tamponu (mL)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (mM)	Δ OD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
2.50	4-karboksi benzen sülfanamid	200	300	-	-	0.5906	590.6	2953	100
2.47				30	5.00	0.5454	545.4	2727	92.35
2.46				40	6.67	0.5065	506.5	2532.5	85.76
2.45				50	8.33	0.3942	394.2	1971	66.75
2.44				60	10.00	0.3018	301.8	1509	51.10
2.43				70	11.60	0.2073	207.3	1036.5	35.10
2.50	2,4 dikloro-5-sülfamoil benzoik asit	200	300	-	-	0.5906	590.6	2953	100
2.45				50	1.67	0.4957	495.7	2478.5	83.93
2.43				75	2.50	0.4270	427.0	2135	72.30
2.42				85	2.83	0.2986	298.6	1493	50.56
2.40				100	3.33	0.2325	232.5	1162.5	39.37
2.38				115	3.83	0.1587	158.7	789	26.72



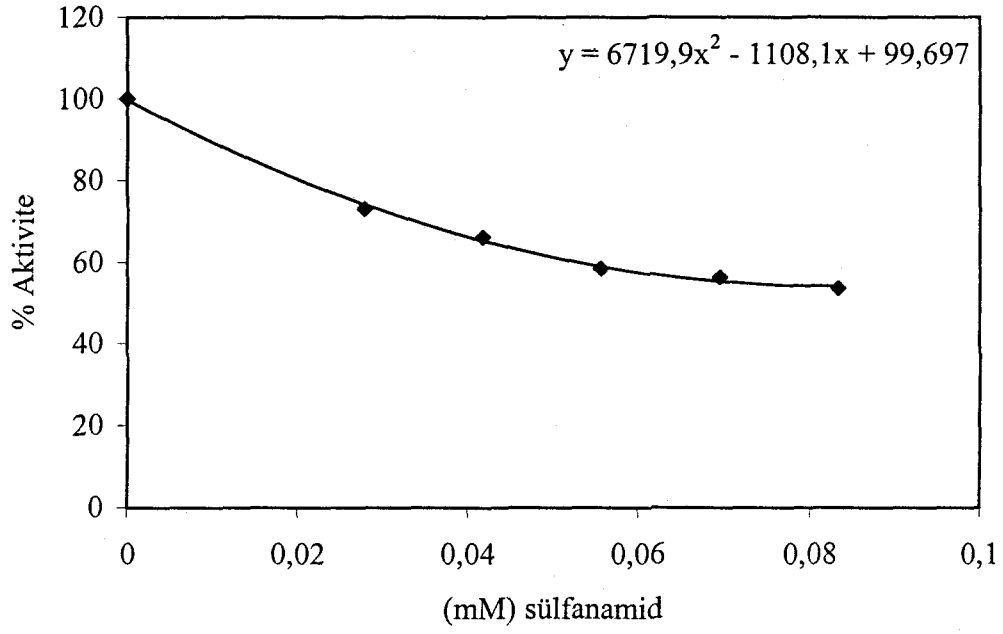
Şekil 3.36 YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda 4-karboksi benzen sülfanamid için % aktivite-[I] grafiği



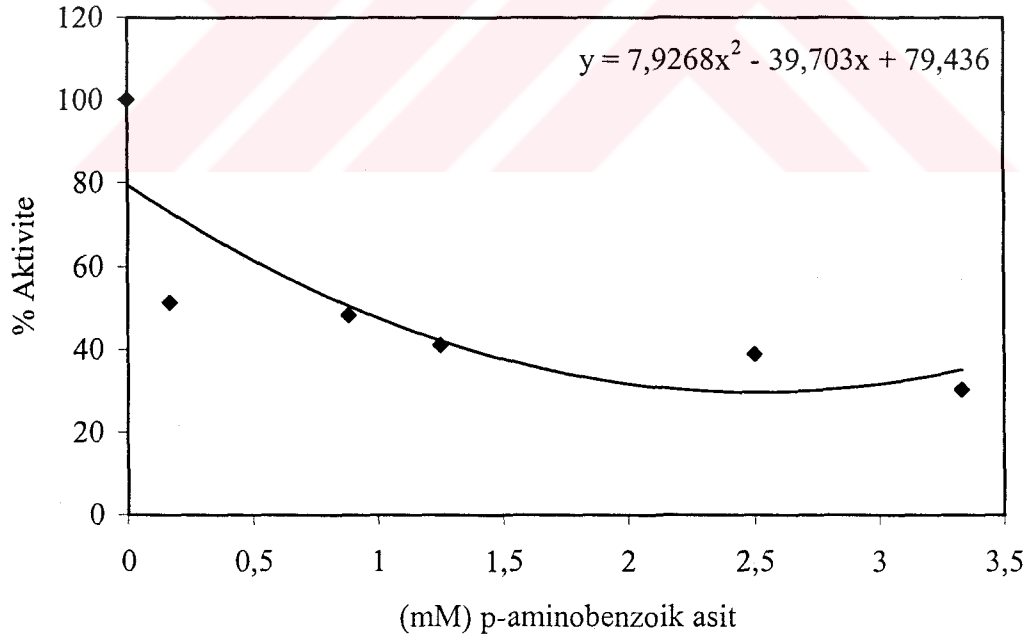
Şekil 3.37 YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda 2,4 dikloro-5-sülfamoil benzoik asit için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.20 YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sülfanamid ve p-aminobenzoik asidin, I₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tamponu (mL)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat çözeltisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mL.dak)	% Aktivite
2.50	sülfanamid	200	300	-	-	0.5906	590.6	2953	100
2.45				50	0.0278	431.0	2155	72.98	
2.43				75	0.0417	390.0	1950	66.03	
2.40				100	0.0556	344.7	1723.5	58.36	
2.38				125	0.0694	331.8	1659	56.18	
2.35				150	0.0833	315.6	1578	53.44	
2.50	p-aminobenzoik asit	200	300	-	-	0.5345	534.5	2672.5	100
2.49				10	0.167	275.3	1376.5	51.51	
2.45				50	0.833	258.2	1291	48.31	
2.43				75	1.250	219.8	1099	41.12	
2.35				150	2.500	208.0	1040	38.91	
2.30				200	3.333	162.0	810	30.31	



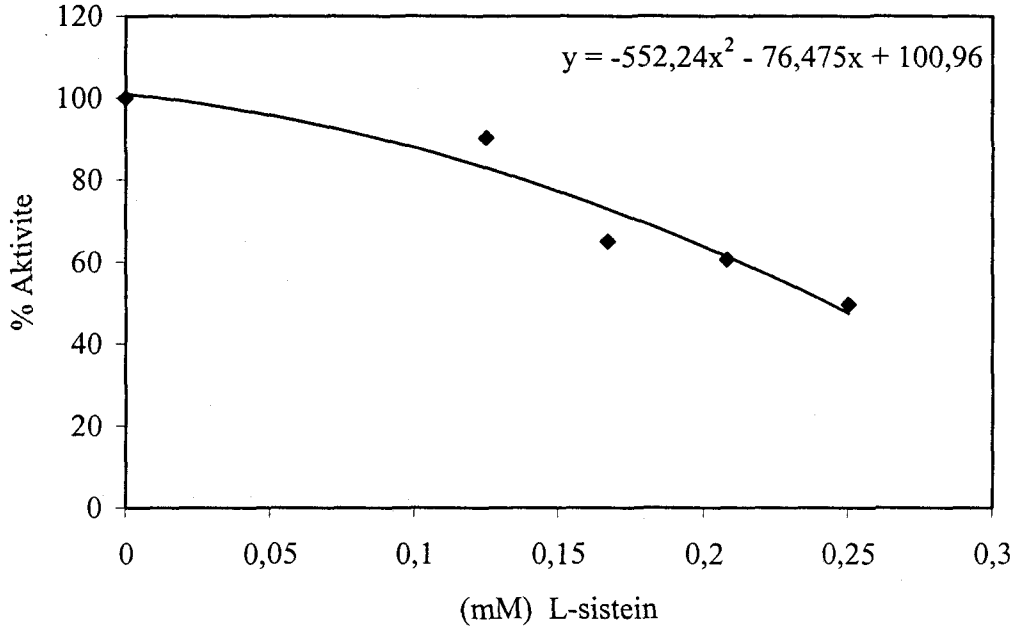
Şekil 3.38 YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda sulfanamid için % aktivite-[I] grafiği



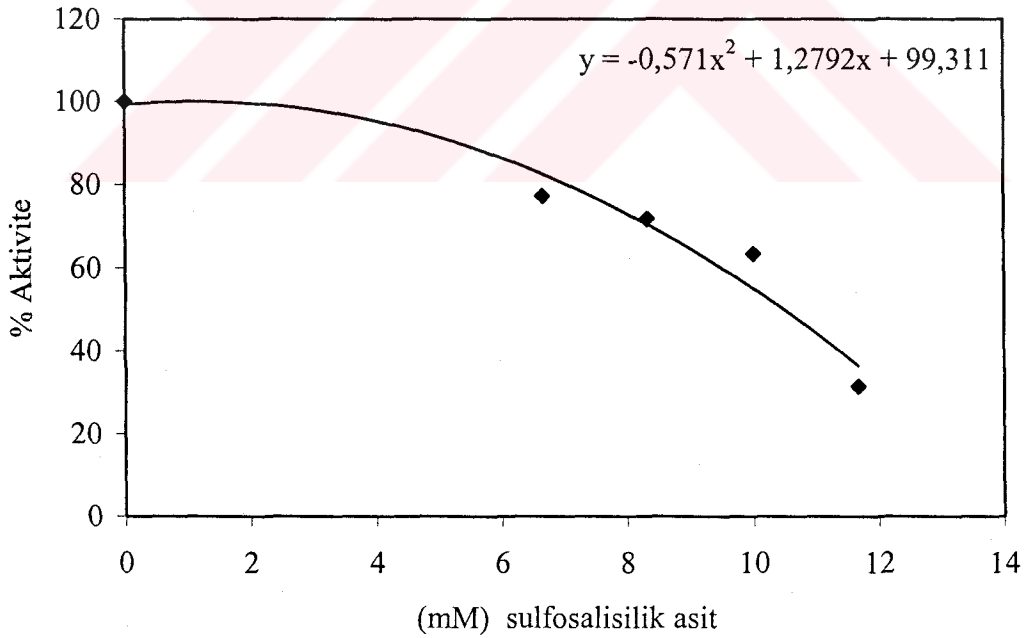
Şekil 3.39 YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda p-aminobenzoik asit için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.21 YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-sistein ve sulfosalisilik asidin, I₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tamponu (mL)	Inhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat çözeltisi hacmi (µL)	Inhibitör çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
2.50	L-sistein	200	300	-	-	0.3074	307.4	1537	100
2.42				75	0.125	0.2773	277.3	1386.5	90.21
2.40				100	0.167	0.1994	199.4	997	64.87
2.38				125	0.208	0.1858	185.8	929	60.44
2.35				150	0.250	0.1522	152.2	761	49.51
2.50	Sulfosalisilik asit	200	300	-	-	0.5340	534.0	2670	100
2.40				100	6.67	0.4121	412.1	2060.5	77.17
2.38				125	8.33	0.3826	382.6	1913	71.65
2.35				150	10.00	0.3383	338.3	1691.5	63.35
2.32				175	11.67	0.1677	167.7	838.5	31.40



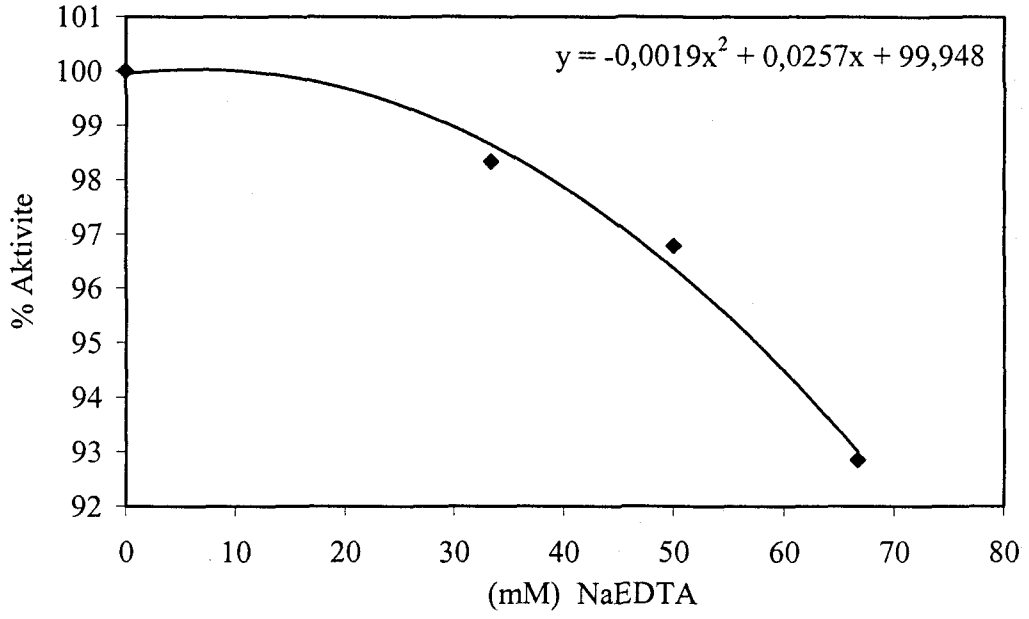
Şekil 3.40 YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda L-sistein için % aktivite-[I] grafiği



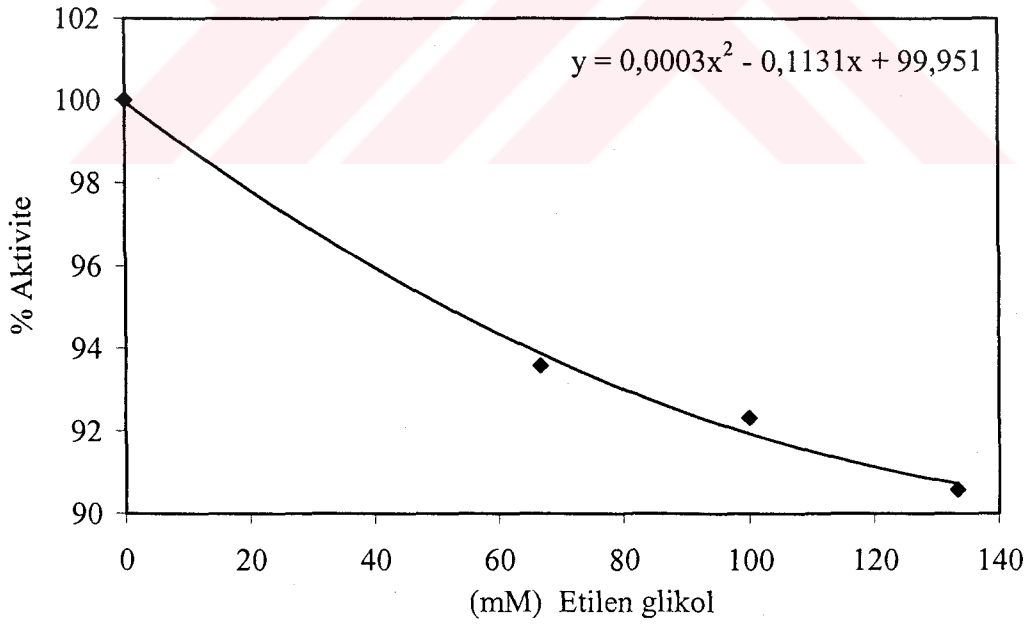
Şekil 3.41 YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda sulfosalisilik için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.22 YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren NaEDTA ve etilen glikolün, I₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tamponu (mL)	Inhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat çözeltisi hacmi (µL)	Inhibitör çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
2.50	Na EDTA	200	300	-	-	0.4780	478.0	2390	100.00
2.30				200	33.33	0.4700	470.0	2350	98.33
2.20				300	50.00	0.4626	462.6	2313	96.78
2.10				400	66.67	0.4438	443.8	2219	92.85
2.50	etilen glikol	200	300	-	-	0.4518	451.8	2259	100
2.30				200	66.67	0.4228	422.8	2114	93.58
2.20				300	100.00	0.4171	417.1	2085.5	92.32
2.10				400	133.33	0.4092	409.2	2046	90.57



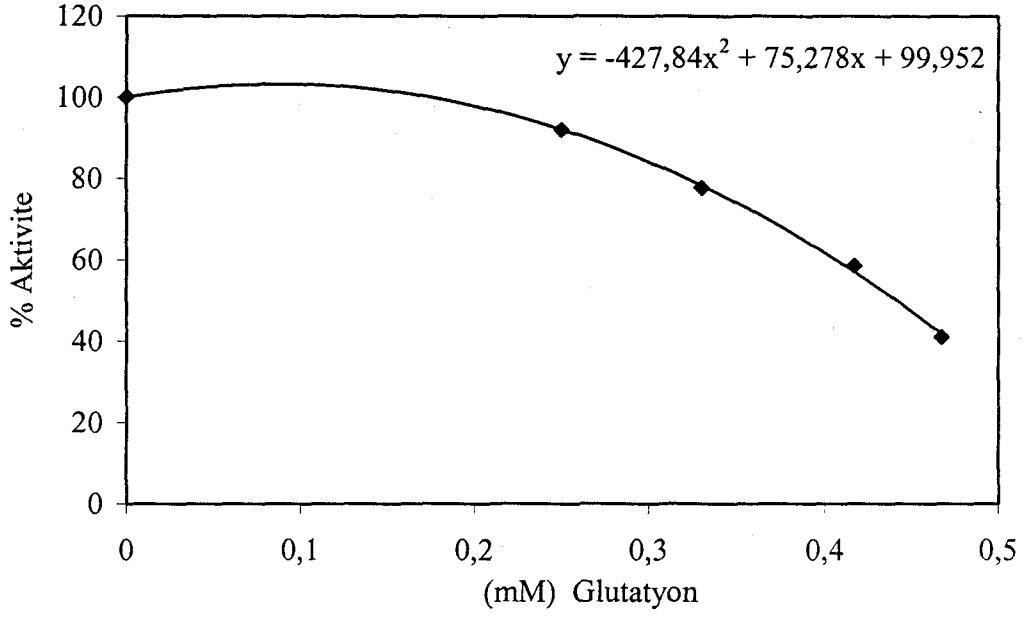
Şekil 3.42 YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda NaEDTA için % aktivite-[I] grafiği



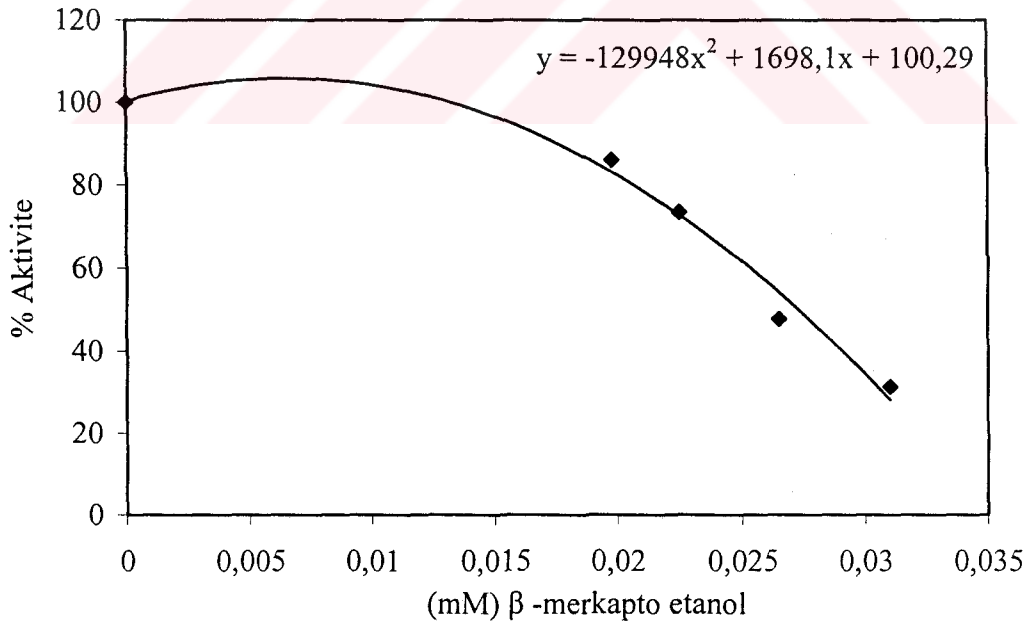
Şekil 3.43 YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda etilen glikol için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.23 YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glutatyon ve β -merkaptto etanolün, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tamponu (mL)	Inhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	Inhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (mM)	Δ OD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
2.50	<i>glutatyon</i>	200	300	-	-	0.4518	451.8	2259	100
2.43				75	0.250	0.4155	415.5	2077.5	91.97
2.40				100	0.333	0.3506	350.6	1753	77.60
2.37				125	0.417	0.2639	263.9	1319.5	58.41
2.36				140	0.467	0.1850	185.0	925	40.95
2.50	<i>β-merkaptto etanol</i>	200	300	-	-	0.4537	453.7	2268.5	100
2.42				75	0.0198	0.3896	389.6	1948	85.87
2.41				85	0.0225	0.3327	332.7	1663.5	73.33
2.40				100	0.0265	0.2162	216.2	1081	47.65
2.38				125	0.0331	0.1416	141.6	708	31.21



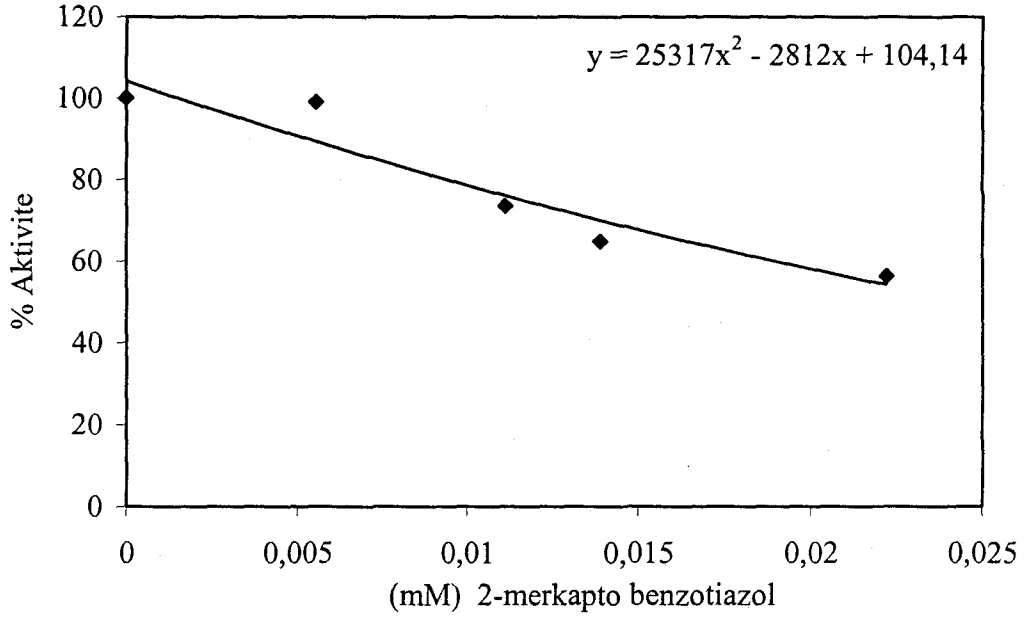
Şekil 3.44 YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda glutatyon için % aktivite-[I] grafiği



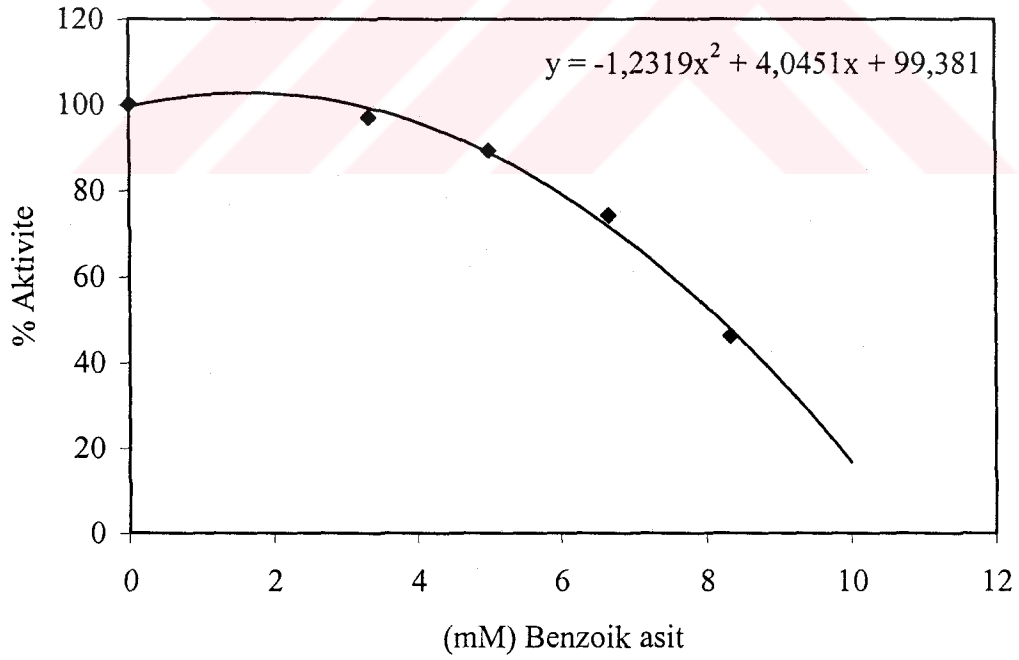
Şekil 3.45 PPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda β -merkapto etanol için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.24 YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 2-merkaptobenzotiazol ve benzoik asidin, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M Na-fosfat tamponu (mL)	Inhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	Inhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki inhibitör Kons.[I] (mM)	Δ OD (420 nm)	U	Aktivite (U/mL.dak)	% Aktivite
2.50	2-merkaptobenzotiazol	200	300	-	-	0.4653	465.3	2326.5	100
2.45				50	0.0056	0.4610	461.0	2305	99.08
2.40				100	0.0111	0.3418	341.8	1709	73.46
2.37				125	0.0139	0.3018	301.8	1509	64.86
2.30				200	0.0222	0.2616	261.6	1308	56.22
2.50	benzoik asit	200	300	-	-	0.4625	462.5	2312.5	100
2.45				50	3.33	0.4486	448.6	2243	96.99
2.43				75	5.00	0.4127	412.7	2063.5	89.23
2.40				100	6.67	0.3433	343.3	1716.5	74.23
2.37				125	8.33	0.2131	213.1	1065.5	46.08



Şekil 3.46 YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda 2-merkapto benzotiazol için % aktivite-[I] grafiği



Şekil 3.47 YPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda benzoik için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.25 YPPO enzimi için 10 mM katekol substrat konsantrasyonunda % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları

İnhibitör	I ₅₀ (mM)
β-merkapt etanol	27x10 ⁻³
2-merkapt benzotiazol	86 x10 ⁻³
Glutasyon	19 x10 ⁻²
L-sistein	24 x10 ⁻²
Ditiyoeritritol	28 x10 ⁻²
2,4 dikloro-5-sülfamoil benzoik asit	3.07
p-aminobenzoik asit	4.10
Benzoik asit	8.18
4-karboksi benzen sülfamid	10.26
Sulfosalisilik asit	10.48
Sodyum Azid	16.26
NaEDTA	169.04

3.3.9 YPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin K_i Değerlerinin ve İnhibisyon Türünün Bulunması

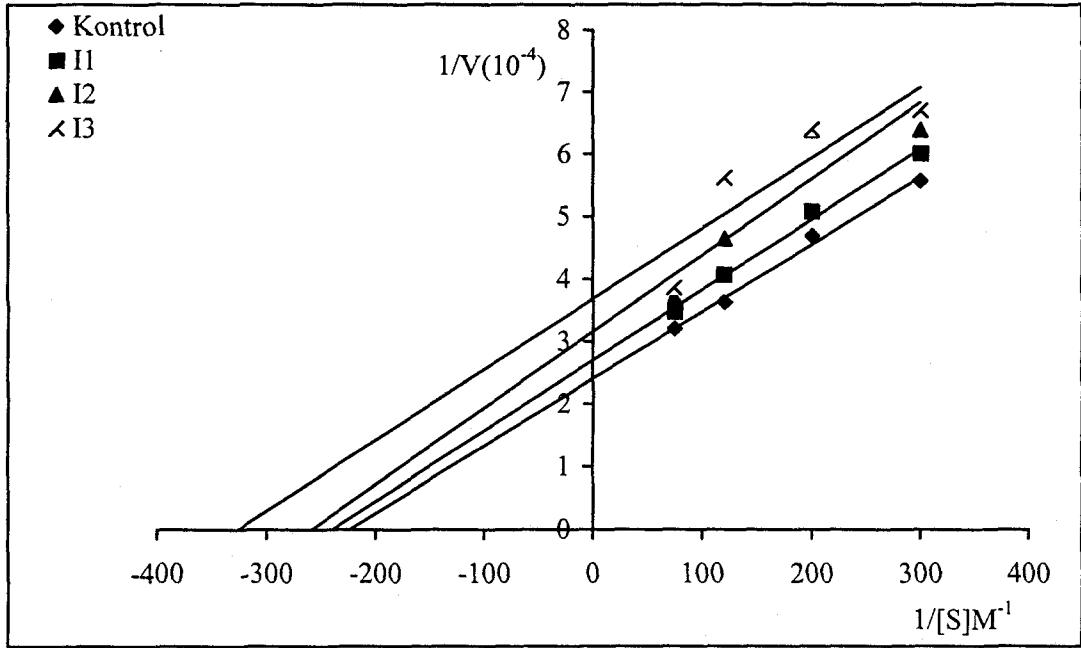
Farklı inhibitörlerin K_i sabitlerinin bulunması amacıyla, önce inhibitörsüz ortamda, optimum şartlarda, beş farklı katekol substrat konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler bulundu. Daha sonra her bir inhibitör için 3 değişik sabit inhibitör konsantrasyonunda, standart aktivite ölçüm koşullarında, katekol substratı kullanılarak aktiviteler belirlendi (Çizelge 3.26 –3.29). $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak, Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.48 –3.51). Bu grafiklerden yararlanarak K_i değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi (Çizelge 3.30). K_i değerleri bölüm 2.2.8.6’da anlatıldığı gibi bulundu.

Çizelge 3.26 YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ditiyoeritrol' ün katekol substratıyla K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

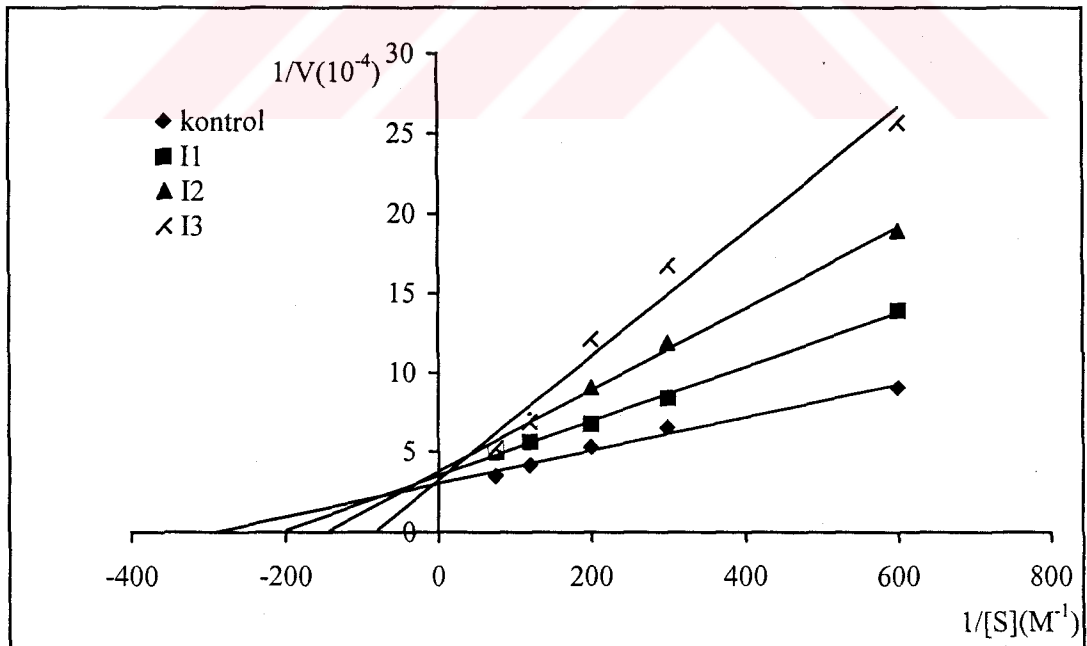
0.2 M, pH 7.00 Na-fosfat tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Δ OD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2750		50	-	3	1.67	0.2148	214.8	1074	9.311	600
2700		100	-		3.33	0.3592	359.2	1796	5.560	300
2650		150	-		5.00	0.4267	426.7	2134	4.687	200
2550		250	-		8.33	0.5516	551.6	2758	3.626	120
2400		400	-		13.33	0.6241	624.1	3121	3.205	75
2700		50	50		1.67	0.0957	95.7	479	20.90	600
2650		100	50		3.33	0.3330	333	1665	6.006	300
2600		150	50		5.00	0.3936	393.6	1968	5.081	200
2500	200	250	50		8.33	0.4915	491.5	2458	4.069	120
2350		400	50		13.33	0.5757	575.7	2879	3.474	75
2675		50	75		1.67	0.0393	39.3	197	50.890	600
2625		100	75		3.33	0.3130	313	1565	6.390	300
2575		150	75		5.00	0.3133	313.3	1567	6.384	200
2475		250	75		8.33	0.4302	430.2	2151	4.649	120
2325		400	75		13.33	0.5389	538.9	2695	3.711	75
2650		50	100		1.67	0.0128	12.8	64	156.300	600
2600		100	100		3.33	0.2985	298.5	1493	6.700	300
2550		150	100		5.00	0.3125	312.5	1563	6.400	200
2450		250	100		8.33	0.3561	356.1	1781	5.616	120
2300		400	100		13.33	0.5181	518.1	2591	3.860	75

Çizelge 3.27 YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sulfosalisilik asit'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M, pH 7.00 Na-fosfat tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Δ OD (420 nm)	U	Aktivite (U/mL.dak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2750		50	-		1.67	0.2222	222.2	1111	9.000	600
2700		100	-		3.33	0.3074	307.4	1537	6.506	300
2650		150	-		5.00	0.3783	378.3	1892	5.287	200
2550		250	-		8.33	0.4841	484.1	2421	4.131	120
2400		400	-		13.33	0.5739	573.9	2870	3.485	75
2650		50	100		1.67	0.1440	144	720	13.89	600
2600		100	100		3.33	0.2389	238.9	1195	8.372	300
2550		150	100		5.00	0.2966	296.6	1483	6.743	200
2450		250	100		8.33	0.3562	356.2	1781	5.615	120
2300	200	400	100	3	13.33	0.4005	400.5	2003	4.994	75
2600		50	150		1.67	0.1059	1059	530	18.890	600
2550		100	150		3.33	0.1686	1686	843	11.860	300
2500		150	150		5.00	0.2212	2212	1106	9.042	200
2400		250	150		8.33	0.2850	285	1425	7.018	120
2250		400	150		13.33	0.3920	392	1960	5.102	75
2575		50	175		1.67	0.0780	78	390	2.564	600
2525		100	175		3.33	0.1196	119.6	598	1.672	300
2475		150	175		5.00	0.1652	165.2	826	1.211	200
2375		250	175		8.33	0.2921	292.1	1461	6.847	120
2225		400	175		13.33	0.3841	384.1	1921	5.207	75



Şekil 3.48 YPPO enzimi aktivitesi üzerine ditiyoeritritol'ün inhibisyon etkisi. $[I_1]=7.94 \times 10^{-5}$, $[I_2]=11.91 \times 10^{-5}$, $[I_3]=15.87 \times 10^{-5}$



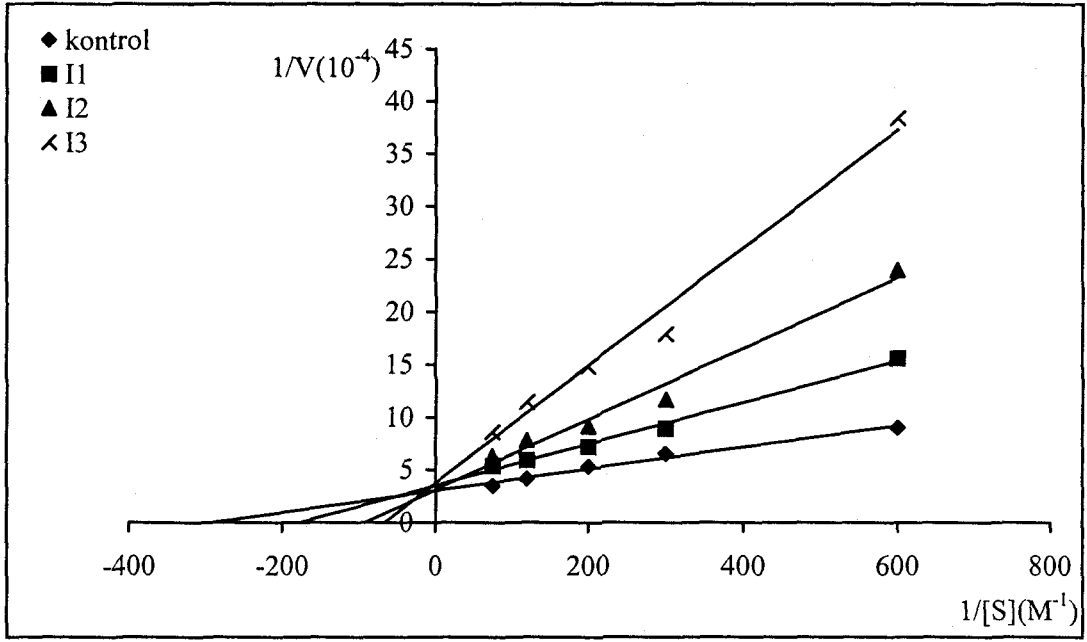
Şekil 3.49 YPPO enzimi aktivitesi üzerine sulfosalisilik asidin inhibisyon etkisi. $[I_1]=6.67 \times 10^{-3}$, $[I_2]=10.00 \times 10^{-3}$, $[I_3]=11.67 \times 10^{-3}$

Çizelge 3.28 YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sodyum azidin, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

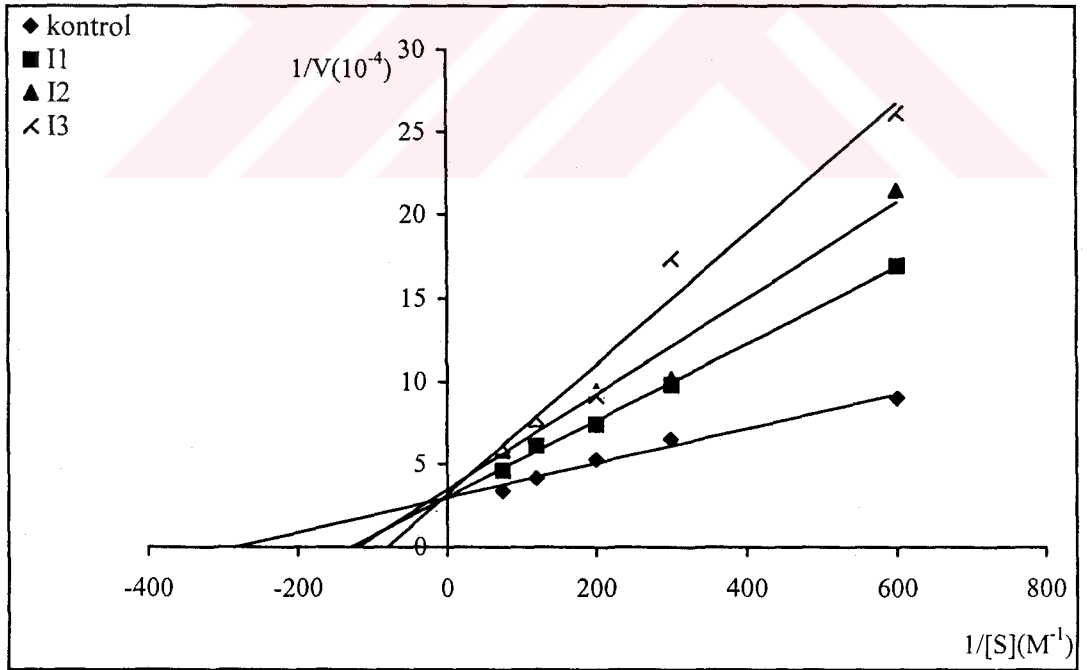
0.2 M, pH 7.00 Na-fosfat tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	AOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2750	200	50	-	3	1.67	0.2222	222.2	1111	9.000	600
2700		100	-		3.33	0.3074	307.4	1537	6.506	300
2650		150	-		5.00	0.3783	378.3	1892	5.287	200
2550		250	-		8.33	0.4841	484.1	2421	4.131	120
2400		400	-		13.33	0.5739	573.9	2870	3.485	75
2700		50	50		1.67	0.1281	1281	641	15.610	600
2650		100	50		3.33	0.2239	2239	1120	8.933	300
2600		150	50		5.00	0.2770	2770	1385	7.220	200
2500		250	50		8.33	0.3387	3387	1694	5.905	120
2350		400	50		13.33	0.3712	3712	1856	5.388	75
2675		50	75		1.67	0.0834	834	417	23.980	600
2625		100	75		3.33	0.1710	1710	855	11.700	300
2575		150	75		5.00	0.2188	2188	1094	9.141	200
2475		250	75		8.33	0.2572	2572	1286	7.776	120
2325		400	75		13.33	0.3169	3169	1585	6.311	75
2650		50	100		1.67	0.0521	521	261	38.390	600
2600	100	100	3.33	0.1118	1118	559	17.890	300		
2550	150	100	5.00	0.1348	1348	674	14.840	200		
2450	250	100	8.33	0.1750	1750	875	11.430	120		
2300	400	100	13.33	0.2323	2323	1162	8.610	75		

Çizelge 3.29 YPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-sistein'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.2 M, pH 7.00 Na-fosfat tamponu (μ L)	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	Inhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	AOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2750		50	-		1.67	0.2222	222.2	1111	9.000	600
2700		100	-		3.33	0.3074	307.4	1537	6.506	300
2650		150	-		5.00	0.3783	378.3	1892	5.287	200
2550		250	-		8.33	0.4841	484.1	2421	4.131	120
2400		400	-		13.33	0.5739	573.9	2870	3.485	75
2675		50	75		1.67	0.1180	118	590	16.950	600
2625		100	75		3.33	0.2038	203.8	1019	9.814	300
2575		150	75		5.00	0.2690	269	1345	7.435	200
2475		250	75		8.33	0.3268	326.8	1634	6.120	120
2325	200	400	75	3	13.33	0.4332	433.2	2166	4.616	75
2650		50	100		1.67	0.9320	93.2	466	21.460	600
2600		100	100		3.33	0.1968	196.8	984	10.160	300
2550		150	100		5.00	0.2118	211.8	1059	9.443	200
2450		250	100		8.33	0.2596	259.6	1298	7.704	120
2300		400	100		13.33	0.3440	344	1720	5.814	75
2600		50	150		1.67	0.7660	76.6	383	26.110	600
2550		100	150		3.33	0.1152	115.2	576	17.360	300
2500		150	150		5.00	0.2182	218.2	1091	9.165	200
2400		250	150		8.33	0.2560	256	1280	7.813	120
2250		400	150		13.33	0.3266	326.6	1633	6.124	75



Şekil 3.50 YPPO enzimi aktivitesi üzerine sodyum azidin inhibisyon etkisi. $[I_1]=1.0 \times 10^{-2}$, $[I_2]=1.5 \times 10^{-2}$, $[I_3]=2.0 \times 10^{-2}$



Şekil 3.51 YPPO enzimi aktivitesi üzerine L-sistein'in inhibisyon etkisi. $[I_1]=2.5 \times 10^{-3}$, $[I_2]=3.33 \times 10^{-3}$, $[I_3]=5.0 \times 10^{-3}$

Çizelge 3.30 YPPO enziminin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri

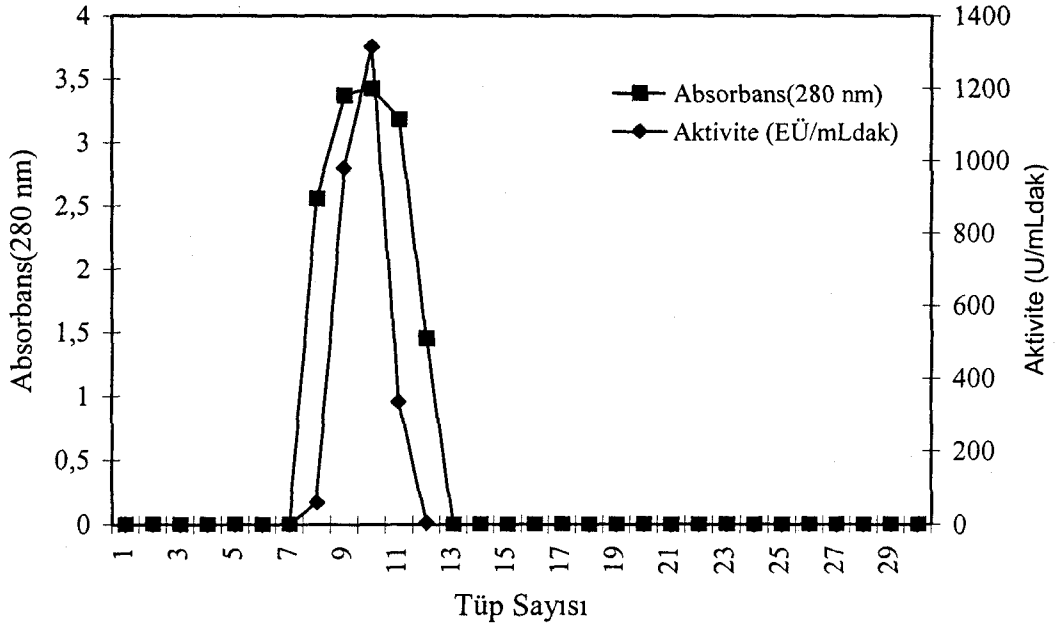
İnhibitör	I [mM]	K_i [mM]	Ortalama K_i değerleri[mM]	İnhibisyon Türü
Ditiyoeritritol	0.079	7.07×10^{-6}	8.82×10^{-6}	unkompetatif
	0.012	9.07×10^{-6}		
	0.016	10.35×10^{-6}		
L-sistein	2.50	2.12	2.19	kompetatif
	3.33	2.47		
	5.00	1.98		
Sodyum azid	10.00	15.78	9.58	kompetatif
	15.00	6.95		
	20.00	6.02		
Sulfosalisilik asit	6.67	16.33	10.40	kompetatif
	10.00	10.19		
	11.67	4.67		

3.4 Dut PPO Enzimi (DPPO) İle İlgili Çalışmaların Sonuçları

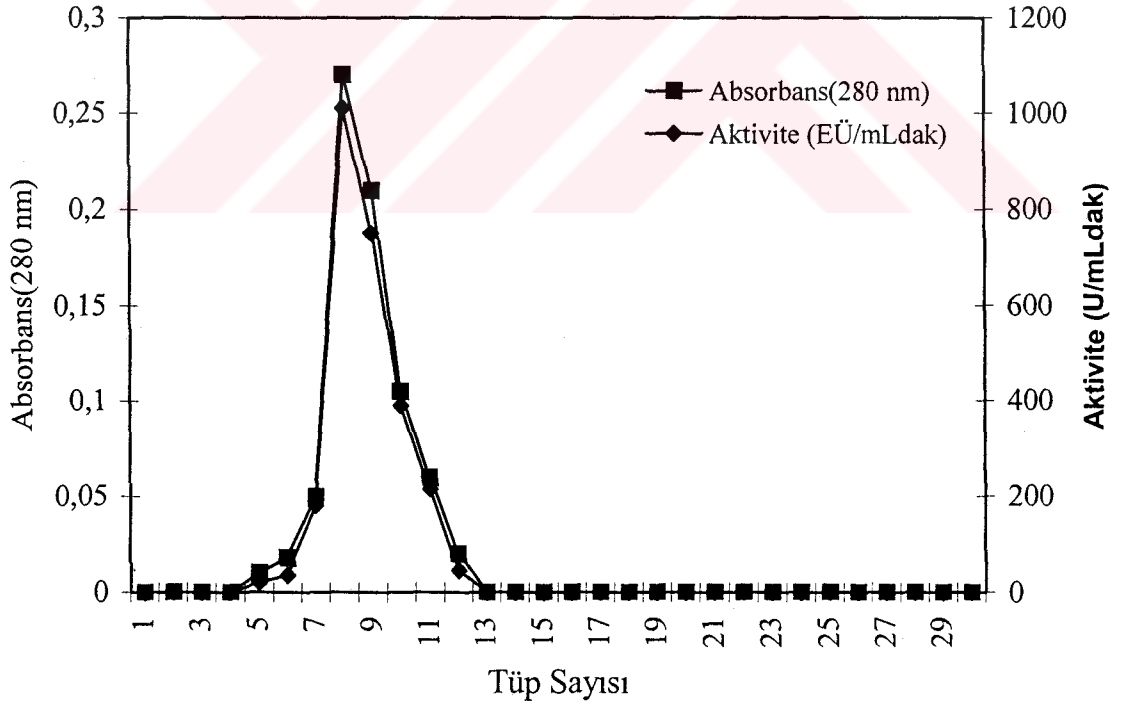
3.4.1 DPPO Enziminin Afinite Kromatografisi İle Saflaştırılması

3.4.1.1 DPPO Enziminin 0.05 M Na_2HPO_4 Tamponu (pH 5.00) İle Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması

Bölüm 3.3.1.1'de yapılan işlemlerin aynısı DPPO enzimi üzerine uygulandı ve bulunan sonuçlar Şekil 3.52-3.53, 3.56 ve Çizelge 3.31'de verildi.



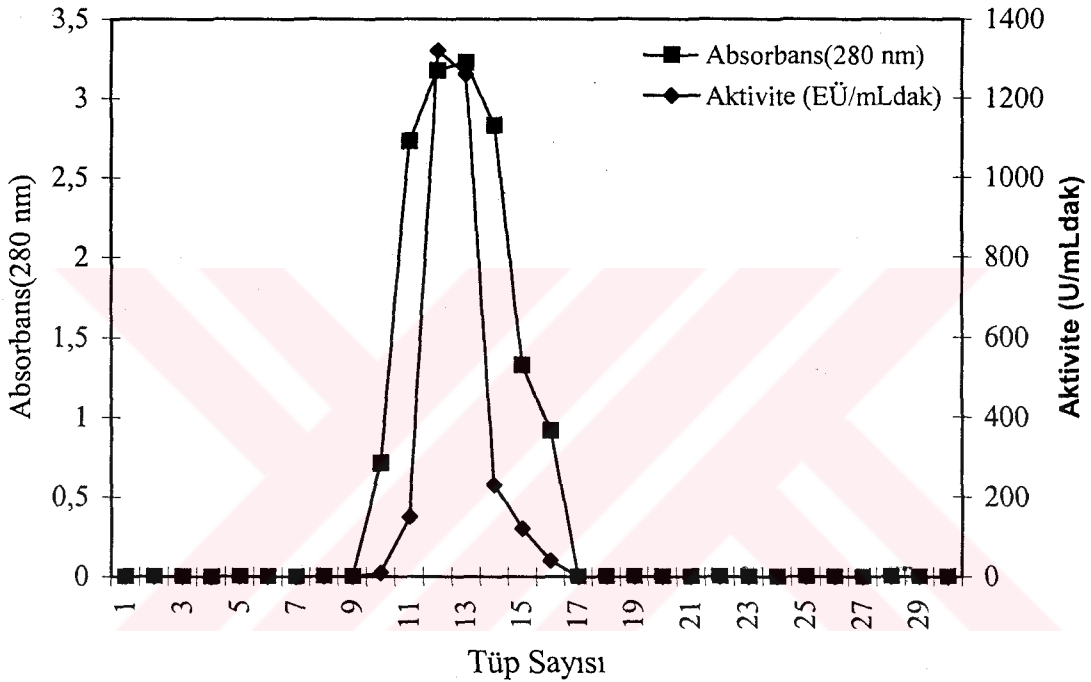
Şekil 3.52 Na₂HPO₄ tamponu (pH 5.00) ile dengelenmiş afinite kolonunun yıkama çözeltilerindeki DPPPO'nun absorbans- aktivite grafiği



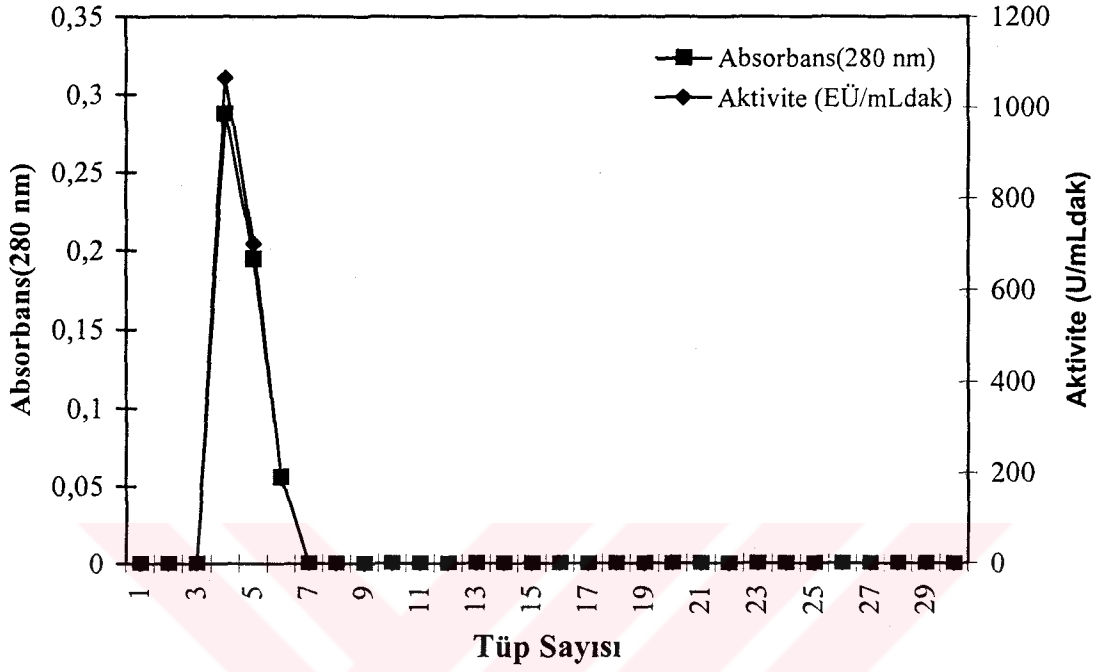
Şekil 3.53 Na₂HPO₄ tamponu (pH 5.00) ile dengelenmiş afinite kolonundan saflaştırılan DPPPO'nun absorbans-aktivite grafiği

3.4.1.2 DPPO Enziminin 0.05 M Na₂HPO₄ Tamponu (pH 6.00) İle Dengelenmiş Kolondan Saflaştırılması

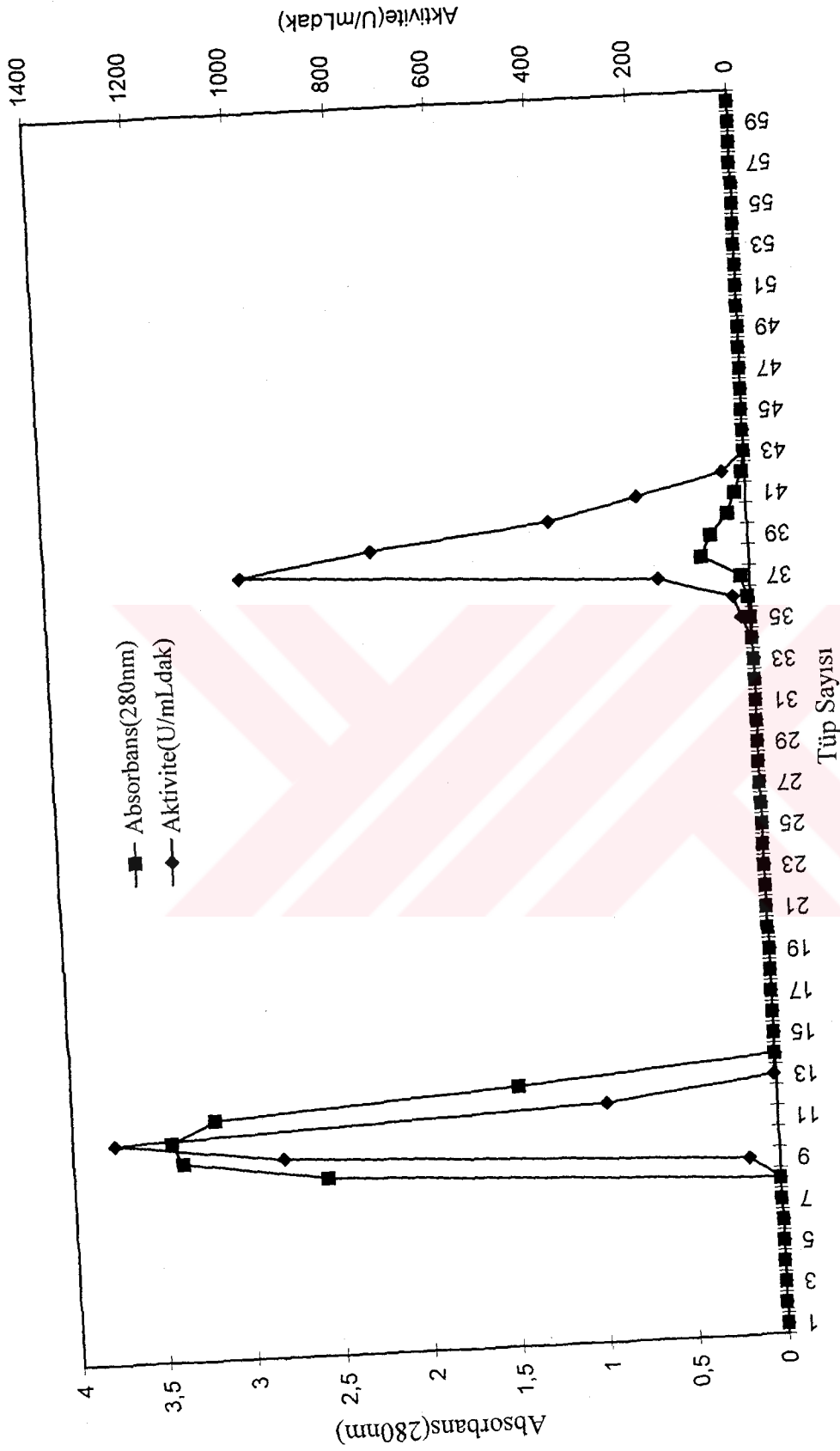
Bölüm 3.3.1.2’de anlatılan işlemlerin aynısı DPPO enzimi üzerine uygulandı ve bulunan sonuçlar Şekil 3.54-3.55 ve 3.57 ve Çizelge 3.38’da verildi.



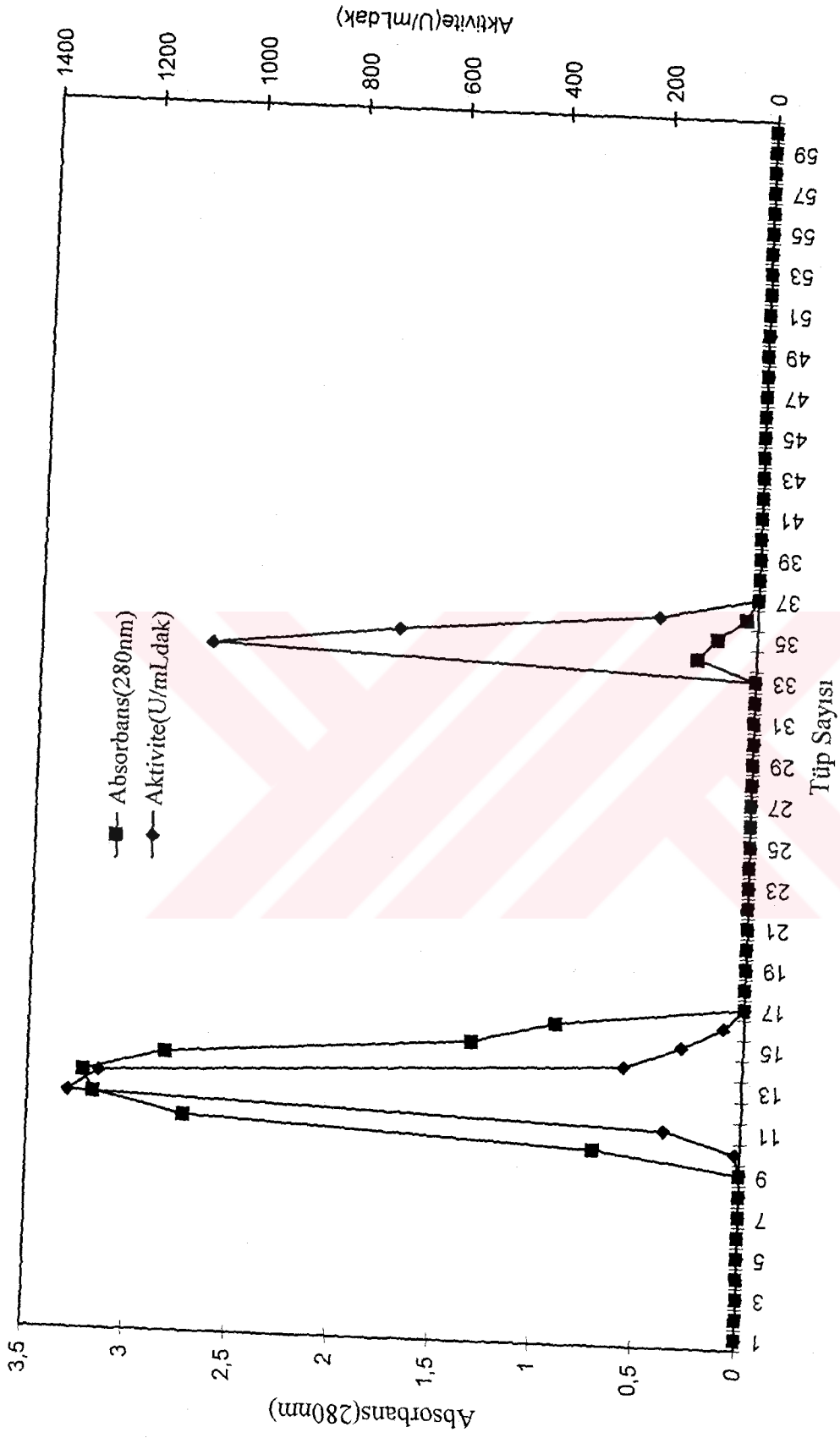
Şekil 3.54 Na₂HPO₄ tamponu (pH 6.00) ile dengelenmiş afinite kolonunun yıkama çözeltilerindeki DPPO'nun absorbands- aktivite grafiği



Şekil 3.55 Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.00) ile dengelenmiş afinite kolonundan saflaştırılan DPPO'nun absorbans-aktivite grafiği



Şekil 3.56 Afinite kolonunun Na_2HPO_4 tamponu (pH 5.00) ile yıkaması işleminden sonra DPPO enziminin 0.05 M Na_2HPO_4 / 1 M tamponu (pH 8.00) ile elusyonu



Şekil 3.57 Afinite kolonunun Na_2HPO_4 tamponu (pH 6.00) ile yıkanması işleminden sonra DPPPO enziminin 0.05 M Na_2HPO_4 / 1 M tamponu (pH 8.00) ile elusyonu

Çizelge 3.31 DPPO enziminin saflaştırma tablosu

Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Aktivite (U/mLdak)	Toplam Aktivite	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg prot)	Verim (%)	Saflaştırma derecesi
Ekstrakt	5	3123	15040	2.067	10.335	1510.88	-	-
Afinite kromatografisi (pH 5.0)	3	1010	3030	0.0131	0.0393	77099.24	20.14	51.03
Afinite kromatografisi (pH 6.0)	3	1065	3195	0.0095	0.0285	112105.26	21.24	74.20

3.4.2 DPPO Enziminin Farklı Substratları için Optimum pH ve Sıcaklık Tayini

DPPO enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık ve pH değerlerini belirlemek amacı ile değişik pH değerlerinde (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0) farklı substratlar (katekol, 4-metil katekol, pirogallol) kullanılarak 20, 30, 35, 45, 55, 65 ve 75 °C'deki reaksiyon hızları spektrofotometrik yöntemle bölüm 2.2.7'de anlatıldığı gibi ayrı ayrı belirlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.32-3.40 ve Şekil 3.58-3.64'de verildi.

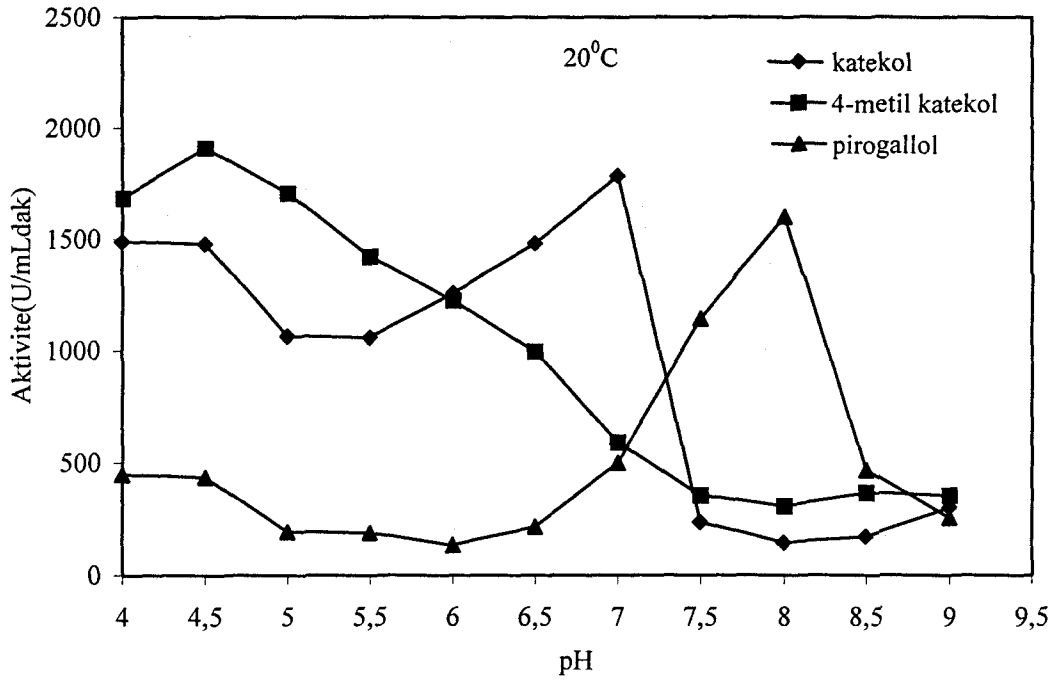


Çizelge 3.32 DPPO enzimi için 20°C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbanans, U₁aktivite ve % aktivite değerleri

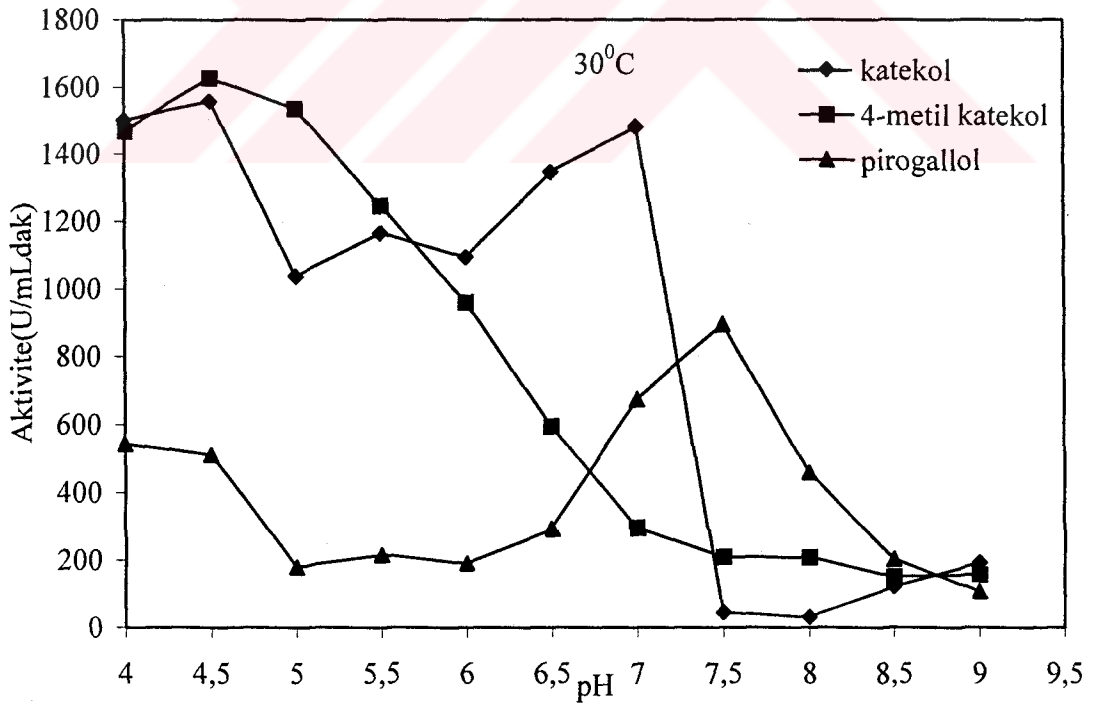
20 °C																
pH	Katekol					4-metil katekol					Pirogallol					
	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite
4.0	0.2976	297.6	1448	83.41	0.3364	336.4	1682	88.16	0.0898	89.8	449	28.04	0.0898	89.8	449	28.04
4.5	0.2955	295.5	1478	82.85	0.3816	381.6	1908	100	0.0872	87.2	436	27.23	0.0872	87.2	436	27.23
5.0	0.2133	213.3	1067	59.81	0.3414	341.4	1707	89.47	0.0388	38.8	194	12.12	0.0388	38.8	194	12.12
5.5	0.2119	211.9	1060	59.42	0.2844	284.4	1422	74.53	0.0376	37.6	188	11.74	0.0376	37.6	188	11.74
6.0	0.2517	251.7	1259	70.57	0.2450	245	1225	64.20	0.0269	26.9	135	8.43	0.0269	26.9	135	8.43
6.5	0.2962	296.2	1481	83.02	0.1996	199.6	998	52.31	0.0431	43.1	216	13.49	0.0431	43.1	216	13.49
7.0	0.3568	356.8	1784	100	0.1184	118.4	592	31.03	0.0999	99.9	500	31.23	0.0999	99.9	500	31.23
7.5	0.0471	47.1	236	13.23	0.0711	71.1	356	18.66	0.2285	228.5	1143	71.39	0.2285	228.5	1143	71.39
8.0	0.0289	28.9	145	8.13	0.0614	61.4	307	16.09	0.3202	320.2	1601	100	0.3202	320.2	1601	100
8.5	0.0341	34.1	171	9.59	0.0734	73.4	367	19.23	0.0933	93.3	467	29.17	0.0933	93.3	467	29.17
9.0	0.0602	60.2	301	16.87	0.0707	70.7	354	18.55	0.0512	51.2	256	15.99	0.0512	51.2	256	15.99

Çizelge 3.33 DPPPO enzimi için 30°C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbsans,U₃aktivite ve % aktivite değerleri

30 °C																
pH	katekol					4-metil katekol					Pirogallol					
	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite
4.0	0.3002	300.2	1501	96.34	0.2938	293.8	1469	90.29	0.1088	108.8	544	60.78				
4.5	0.3116	311.6	1558	100	0.3254	325.4	1627	100	0.1022	102.2	511	57.09				
5.0	0.2073	207.3	1037	66.56	0.3072	307.2	1536	99.41	0.0358	35.8	179	20				
5.5	0.2329	232.9	1165	74.78	0.2493	249.3	1247	76.64	0.0431	43.1	216	24.13				
6.0	0.2186	218.6	1093	70.15	0.1917	191.7	959	58.94	0.0380	38	190	21.23				
6.5	0.2691	269.1	1346	86.39	0.1187	118.7	594	36.51	0.0583	58.3	292	32.63				
7.0	0.2962	296.2	1481	95.06	0.0590	59	295	18.13	0.1347	134.7	674	75.31				
7.5	0.0087	8.7	43.5	2.79	0.0417	41.7	209	12.85	0.1790	179	895	100				
8.0	0.0062	6.2	31	1.99	0.0413	41.3	207	12.72	0.0915	91.5	458	51.17				
8.5	0.0240	24	120	7.70	0.0301	30.1	151	9.28	0.0404	40.4	202	22.57				
9.0	0.0384	38.4	192	12.32	0.0312	31.2	156	9.59	0.0212	21.2	106	11.84				



Şekil 3.58 DPPO enziminin 20 °C’de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği



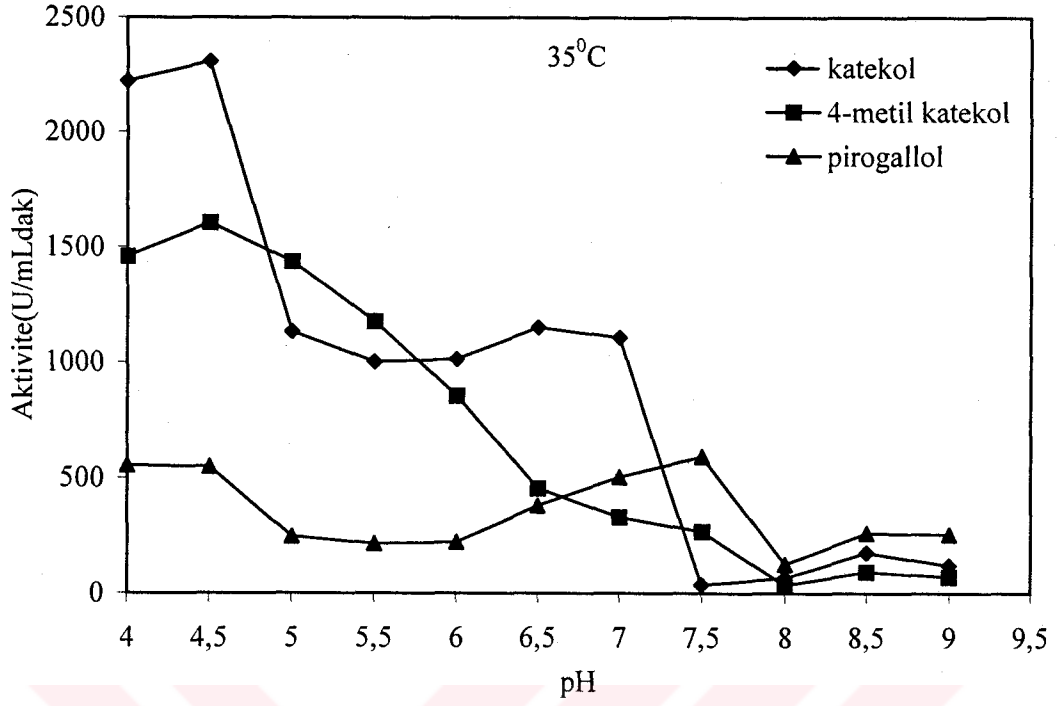
Şekil 3.59 DPPO enziminin 30 °C’de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği

Çizelge 3.34 DPPO enzimi için 35°C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorban_s,U_saktivite ve % aktivite değerleri

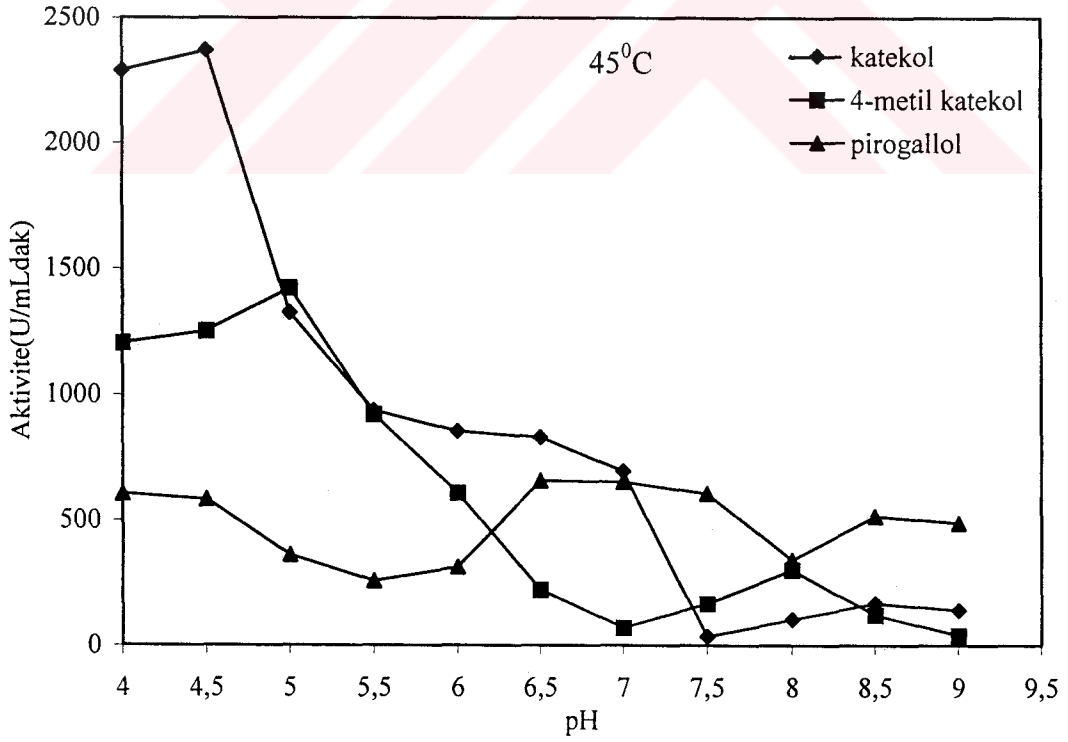
35°C												
pH	katekol				4-metil katekol				Pirogallol			
	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite
4.0	0.4442	444.2	2221	96.23	0.2916	291.6	1458	90.84	0.1108	110.8	554	93.58
4.5	0.4616	461.6	2308	100	0.3210	321	1605	100	0.1095	109.5	548	92.57
5.0	0.2262	226.2	1131	49	0.2871	287.1	1436	89.47	0.0494	49.4	247	41.72
5.5	0.2006	200.6	1003	43.46	0.2351	235.1	1176	73.27	0.0430	43	215	36.32
6.0	0.2028	202.8	1014	43.93	0.1711	171.1	856	53.33	0.0441	44.1	221	37.33
6.5	0.2297	229.7	1149	49.78	0.0908	90.8	454	28.29	0.0758	75.8	379	64.02
7.0	0.2210	221	1105	47.88	0.0657	65.7	329	20.50	0.1005	100.5	503	84.97
7.5	0.0072	7.2	36	1.56	0.0533	53.3	267	16.64	0.1183	118.3	592	100
8.0	0.0134	13.4	67	2.90	0.0067	6.7	34	2.12	0.0525	52.5	126	21.28
8.5	0.0351	35.1	176	7.63	0.0185	18.5	93	5.79	0.0522	52.2	261	44.09
9.0	0.0242	24.2	121	5.24	0.0140	14	70	4.36	0.0510	51	255	43.07

Çizelge 3.35 DPPO enzimi için 45°C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorpsans, U,aktivite ve % aktivite değerleri

45 °C																
pH	katekol					4-metil katekol					Pirogallol					
	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite
4.0	0.4576	457.6	2288	96.58	0.2408	240.8	1204	84.73	0.1212	121.2	606	92.24	0.1212	121.2	606	92.24
4.5	0.4738	473.8	2369	100	0.2503	250.3	1252	88.11	0.1167	116.7	584	88.89	0.1167	116.7	584	88.89
5.0	0.2647	264.7	1324	55.89	0.2842	284.2	1421	100	0.0720	72	360	54.79	0.0720	72	360	54.79
5.5	0.1873	187.3	937	39.55	0.1842	184.2	921	64.81	0.0512	51.2	256	38.96	0.0512	51.2	256	38.96
6.0	0.1707	170.7	854	36.05	0.1216	121.6	608	42.79	0.0626	62.6	313	47.64	0.0626	62.6	313	47.64
6.5	0.1659	165.9	830	35.04	0.0442	44.2	221	15.55	0.1314	131.4	657	100	0.1314	131.4	657	100
7.0	0.1387	138.7	694	29.30	0.0138	13.8	69	4.86	0.1302	130.2	651	99.09	0.1302	130.2	651	99.09
7.5	0.0068	6.8	34	1.44	0.0331	33.1	166	11.68	0.1212	121.2	606	92.24	0.1212	121.2	606	92.24
8.0	0.0206	20.6	103	4.35	0.0599	59.9	300	21.11	0.0680	68	340	51.75	0.0680	68	340	51.75
8.5	0.0334	33.4	167	7.05	0.0241	24.1	121	8.52	0.1027	102.7	514	78.23	0.1027	102.7	514	78.23
9.0	0.0280	28	140	5.91	0.0080	8	40	2.81	0.0976	97.6	488	74.28	0.0976	97.6	488	74.28



Şekil 3.60 DPPO enziminin 35 °C’de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği



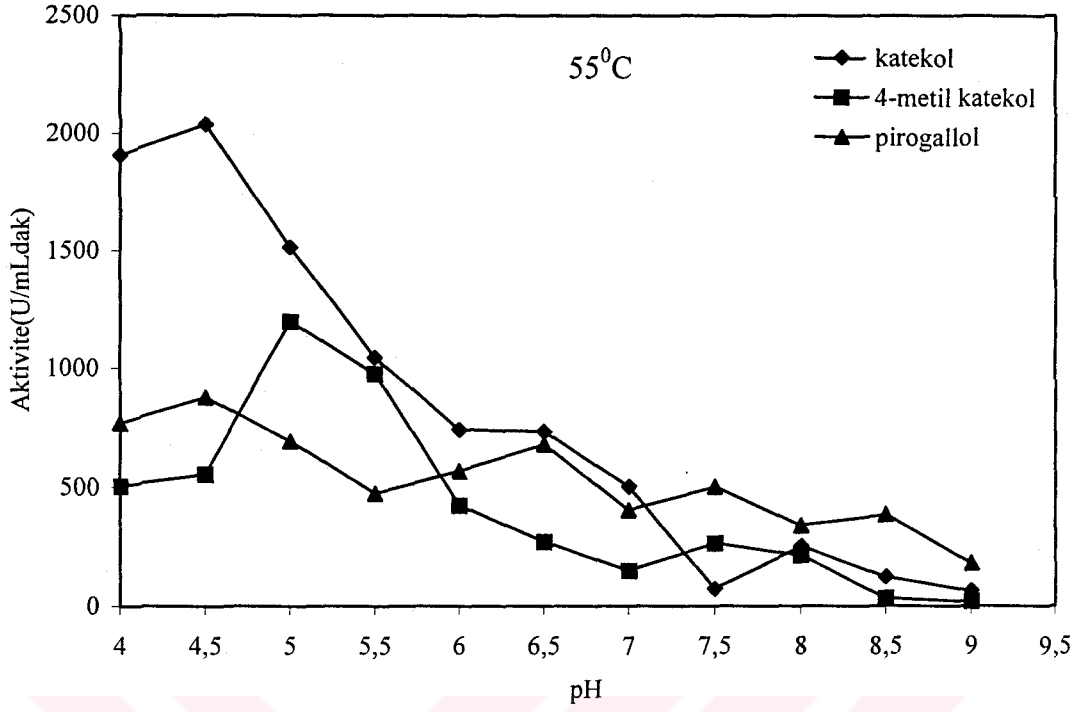
Şekil 3.61 DPPO enziminin 45 °C’de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği

Çizelge 3.36 DPPO enzimi için 55°C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans,U,aktivite ve % aktivite değerleri

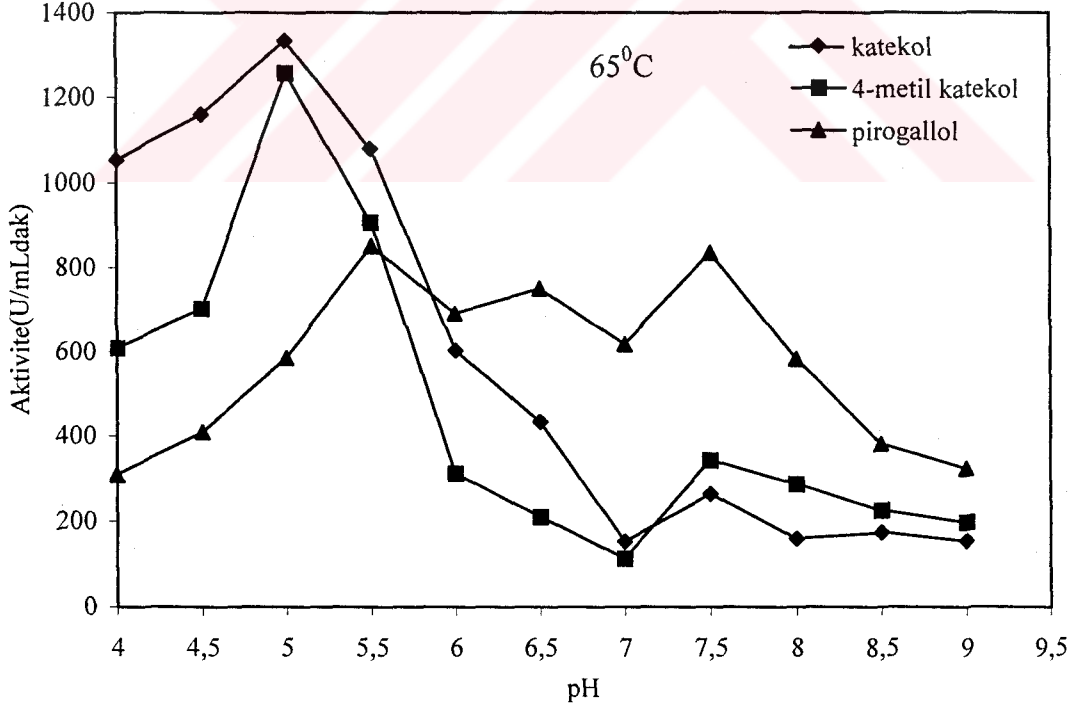
55° C																
pH	katekol					4-metil katekol					Pirogallol					
	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite
4.0	0.3812	381.2	1906	93.52	0.1010	101	505	42.19	0.1536	153.6	768	87.57	0.1754	175.4	877	100
4.5	0.4076	407.6	2038	100	0.1107	110.7	554	46.28	0.1386	138.6	693	79.02	0.1754	175.4	877	100
5.0	0.3029	302.9	1515	74.34	0.2393	239.3	1197	100	0.0948	94.8	474	54.05	0.1134	113.4	567	64.65
5.5	0.2089	208.9	1045	51.28	0.1951	195.1	976	81.54	0.1357	135.7	679	77.42	0.0807	80.7	404	46.07
6.0	0.1482	148.2	741	36.36	0.0848	84.8	424	35.42	0.1002	100.2	501	57.13	0.1134	113.4	567	64.65
6.5	0.1466	146.6	733	35.97	0.0544	54.4	272	22.72	0.0807	80.7	404	46.07	0.1357	135.7	679	77.42
7.0	0.1004	100.4	502	24.63	0.0299	29.9	150	12.53	0.0807	80.7	404	46.07	0.0807	80.7	404	46.07
7.5	0.0146	14.6	73	3.58	0.0530	53	265	22.14	0.1002	100.2	501	57.13	0.1002	100.2	501	57.13
8.0	0.0506	50.6	253	12.41	0.0428	42.8	214	1788	0.0677	67.7	339	38.65	0.0677	67.7	339	38.65
8.5	0.0246	24.6	123	6.04	0.0064	6.4	32	2.67	0.0769	76.9	385	43.90	0.0769	76.9	385	43.90
9.0	0.0126	12.6	63	3.09	0.0038	3.8	19	1.59	0.0362	36.2	181	20.64	0.0362	36.2	181	20.64

Çizelge 3.37 Dut PPO enzimi için 65°C'de, üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorbans,U,aktivite ve % aktivite değerleri

65°C													
pH	katekol				4-metil katekol				Pirogallol				
	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	
4.0	0.2108	210.8	1054	79.07	0.1218	121.8	609	48.45	0.0616	61.6	308	36.15	
4.5	0.2319	231.9	1160	87.02	0.1404	140.4	702	55.85	0.0818	81.8	409	48	
5.0	0.2666	266.6	1333	100	0.2514	251.4	1257	100	0.1169	116.9	585	68.66	
5.5	0.2160	216	1080	81.02	0.1814	181.4	907	72.16	0.1703	170.3	852	100	
6.0	0.1205	120.5	603	45.24	0.0624	62.4	312	24.82	0.1382	138.2	691	81.10	
6.5	0.0868	86.8	434	32.56	0.0422	42.2	211	16.79	0.1501	150.1	751	88.15	
7.0	0.0305	30.5	153	11.48	0.0227	22.7	114	9.07	0.1236	123.6	618	72.54	
7.5	0.0530	53	265	19.88	0.0688	68.8	344	27.37	0.1672	167.2	836	98.12	
8.0	0.0320	32	160	12.00	0.0575	57.5	288	22.91	0.1165	116.5	583	68.43	
8.5	0.0349	34.9	175	13.13	0.0451	45.1	226	17.98	0.0763	76.3	382	44.84	
9.0	0.0310	31	155	11.63	0.0396	39.6	198	15.75	0.0648	64.8	324	38.03	



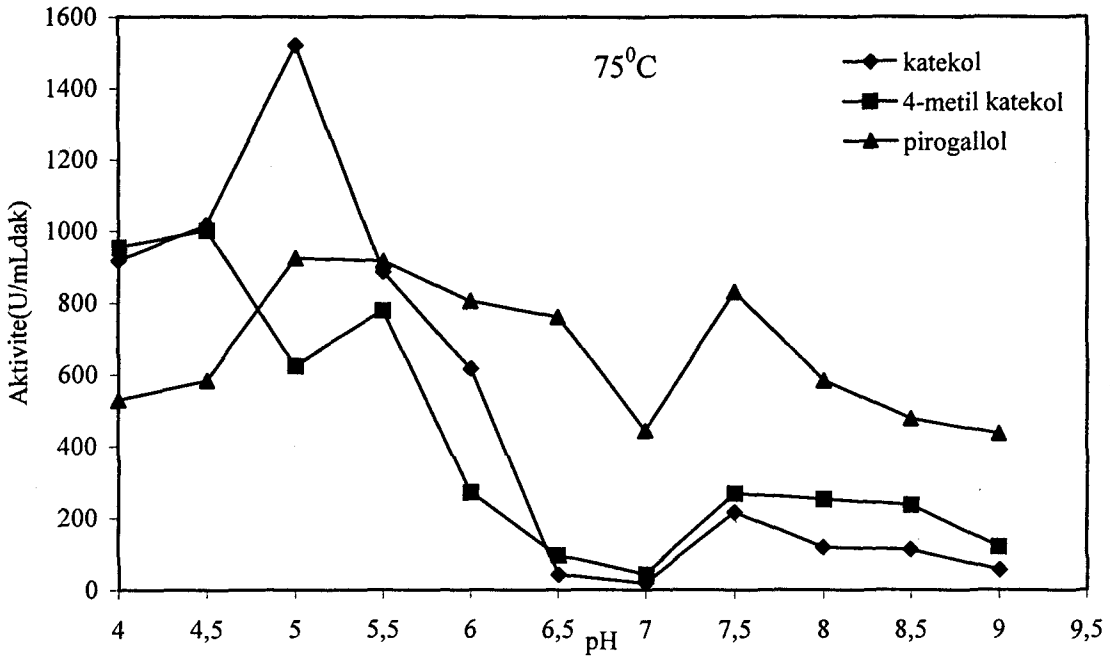
Şekil 3.62 DPPO enziminin 55 °C’de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği



Şekil 3.63 DPPO enziminin 65 °C’de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği

Çizelge 3.38 Dut PPO enzimi için 75°C'de , üç ayrı substratı için farklı pH'larda elde edilen absorpsans, U_{akt}aktivite ve % aktivite değerleri

75°C																
pH	katekol					4-metil katekol					Pirogallol					
	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	%Aktivite
4.0	0.1836	183.6	918	60.43	0.1908	190.8	954	95.30	0.1058	105.8	529	57.25				
4.5	0.2031	203.1	1016	66.89	0.2001	200.1	1001	100	0.1166	116.6	583	63.10				
5.0	0.3038	303.8	1519	100	0.1248	124.8	624	62.34	0.1848	184.8	924	100				
5.5	0.1771	177.1	886	58.33	0.1556	155.6	778	77.72	0.1832	183.2	916	99.13				
6.0	0.1232	123.2	616	40.55	0.0543	54.3	272	27.17	0.1608	160.8	804	87.01				
6.5	0.0083	8.3	42	2.76	0.0192	19.2	96	9.59	0.1520	152	760	82.25				
7.0	0.0036	3.6	18	1.18	0.0085	8.5	43	4.30	0.0885	88.5	443	47.94				
7.5	0.0431	43.1	216	14.22	0.0536	53.6	268	26.77	0.1659	165.9	830	89.83				
8.0	0.0236	23.6	118	7.77	0.0503	50.3	252	25.17	0.1165	116.5	583	63.10				
8.5	0.0224	22.4	112	7.34	0.0471	47.1	236	23.58	0.0953	95.3	477	51.62				
9.0	0.0110	11	55	3.62	0.0240	24	120	11.99	0.0870	87	435	47.08				



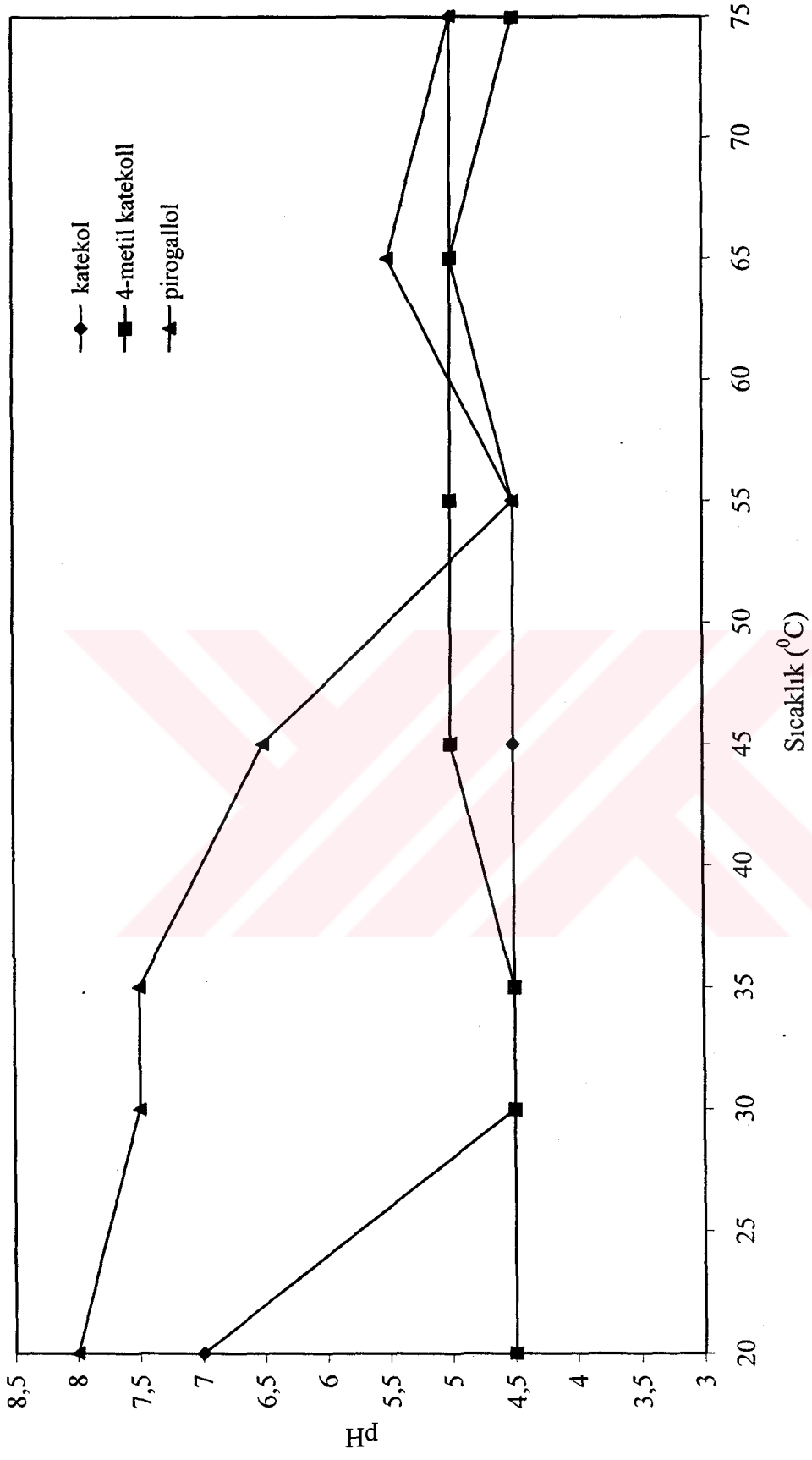
Şekil 3.64 DPPO enziminin 75 °C'de üç farklı substratı için pH-aktivite grafiği

Çizelge 3.39 DPPO enziminin üç farklı substratı için değişik sıcaklıklardaki optimum pH değerleri

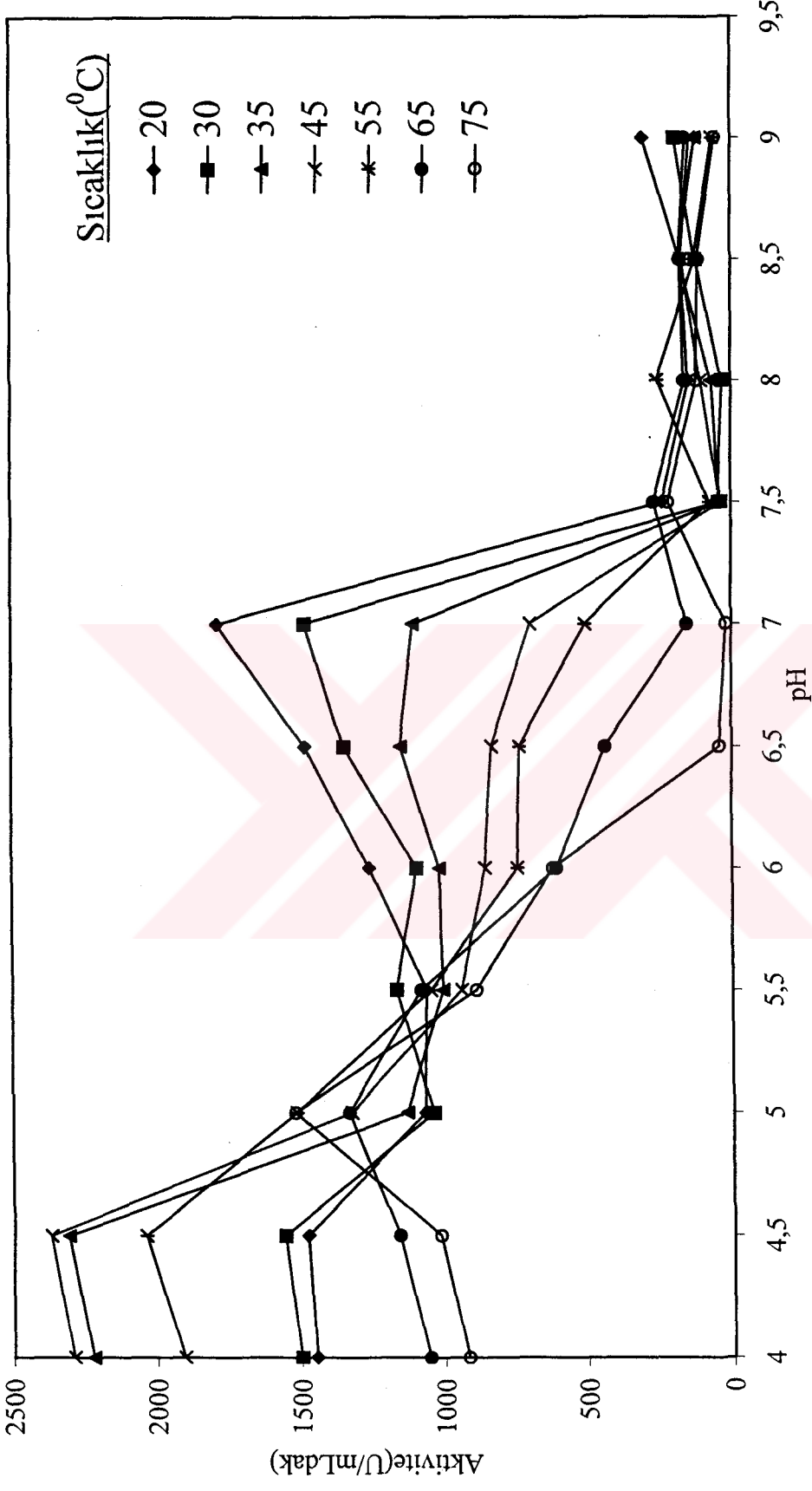
Sıcaklık (°C)	Substrat		
	katekol Optimum pH	4-metil katekol Optimum pH	pirogallol Optimum pH
20	7.0	4.5	8.0
30	4.5	4.5	7.5
35	4.5	4.5	7.5
45	4.5	5.0	6.5
55	4.5	5.0	4.5
65	5.0	5.0	5.5
75	5.0	4.5	5.0

Çizelge 3.40 DPPO enziminin üç ayrı substratı için optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri

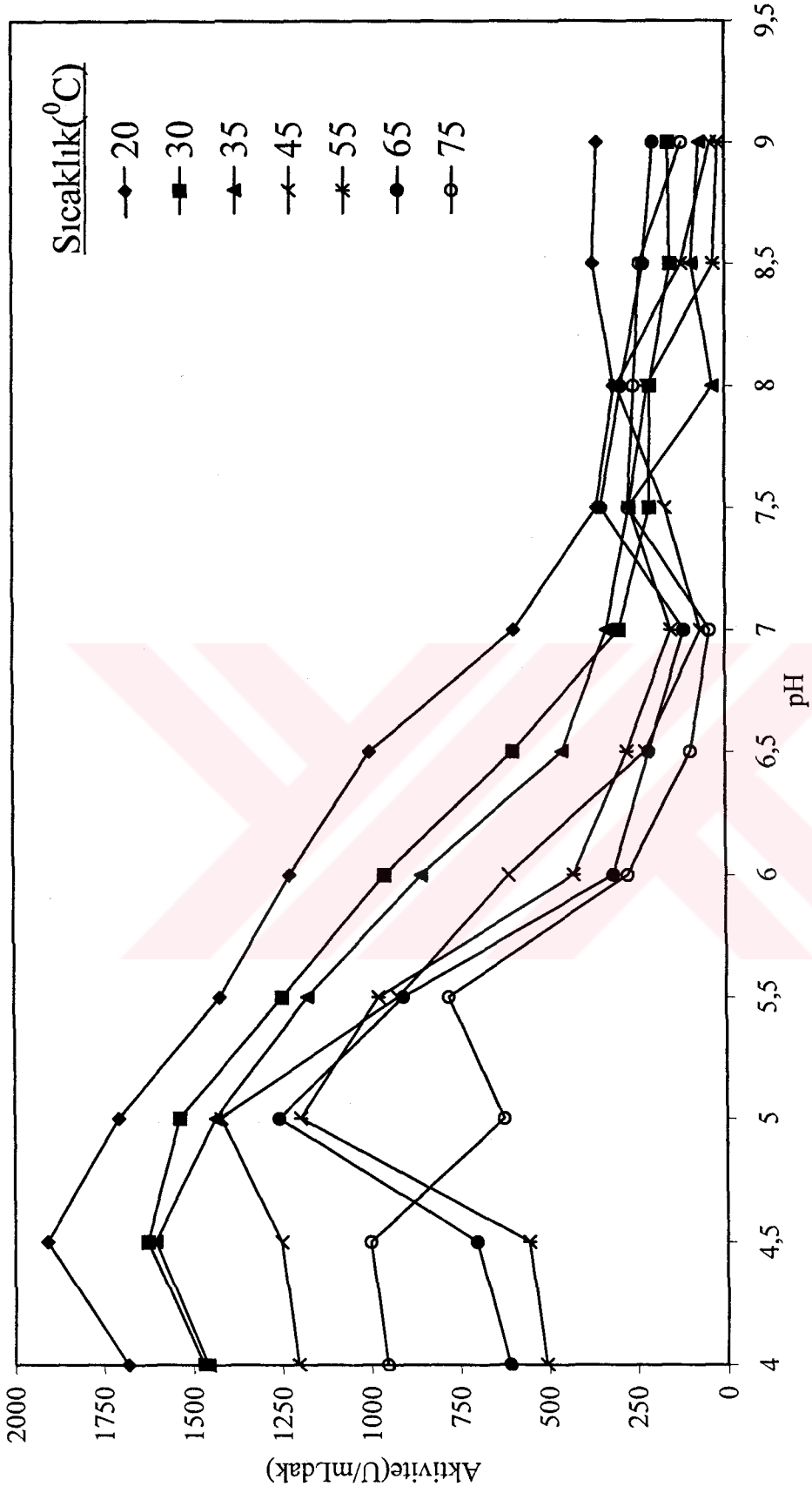
Substrat	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)	Aktivite(U/mL.dak)
katekol	4.5	45	2369
4-metil katekol	4.5	20	1908
pirogallol	8.0	20	1601



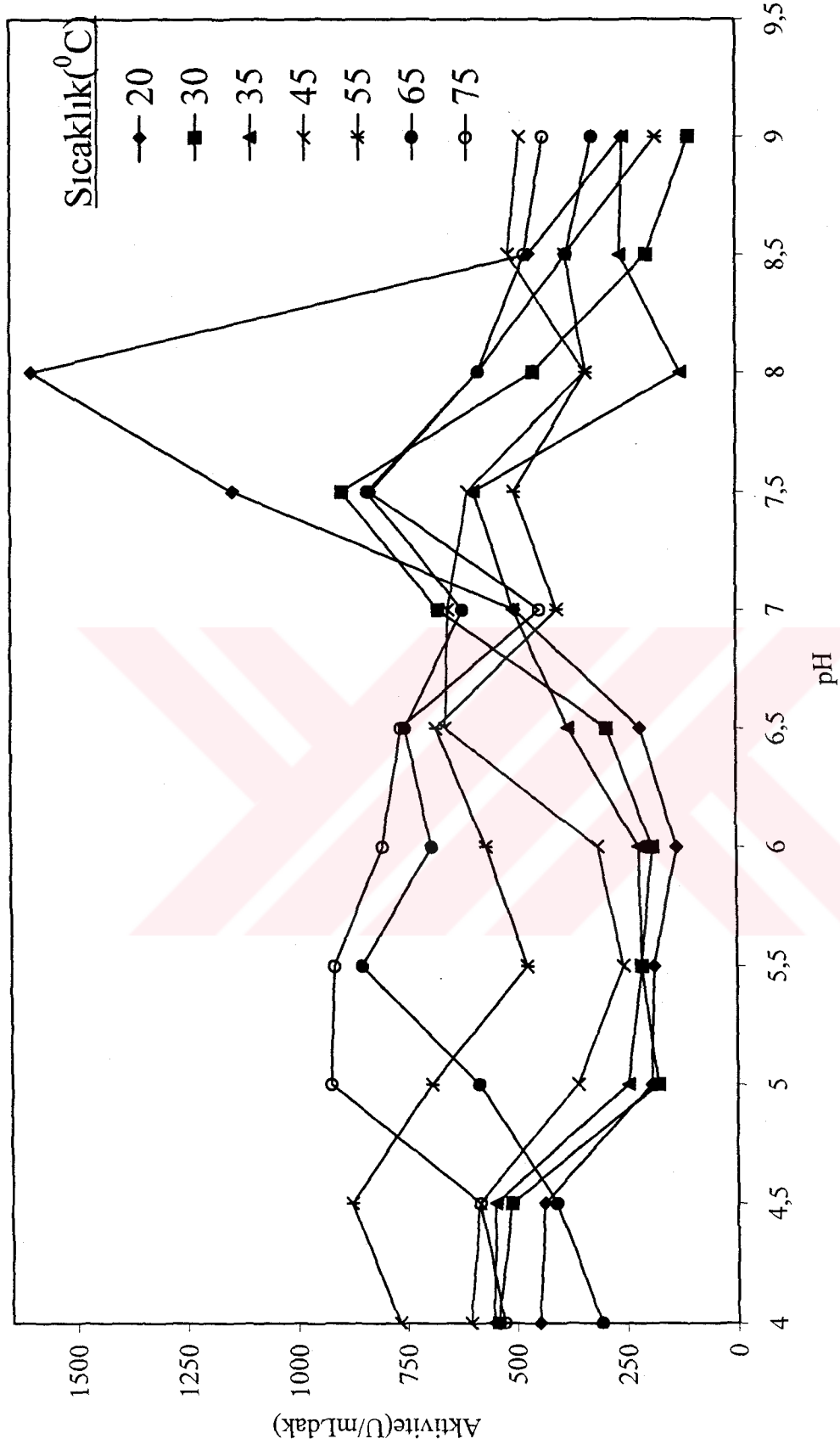
Şekil 3.65 DPPO enziminin üç farklı substratı için değişik sıcaklıklardaki optimum pH değişimini gösteren grafik



Şekil 3.66 DPPO enziminin katekol substratı için değişik sıcaklıklarda pH'ya bağlı aktivite değişimini gösteren grafik.



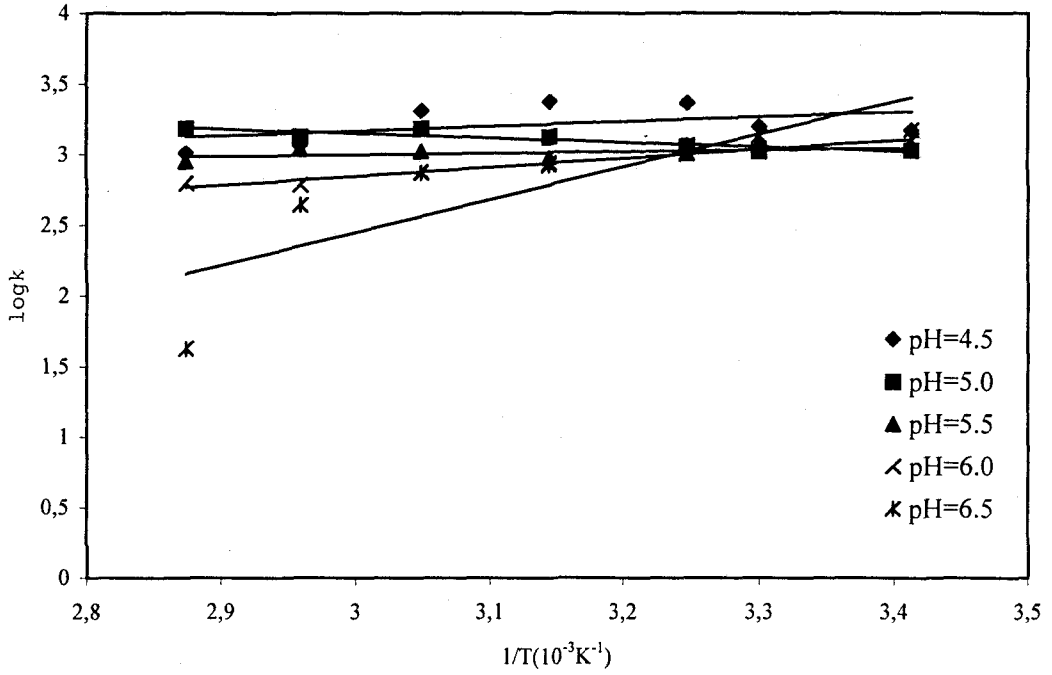
Şekil 3.67 DPPO enziminin 4-metil katekol substratı için değişik sıcaklıklarda pH'ya bağlı aktivite değişimini gösteren grafik



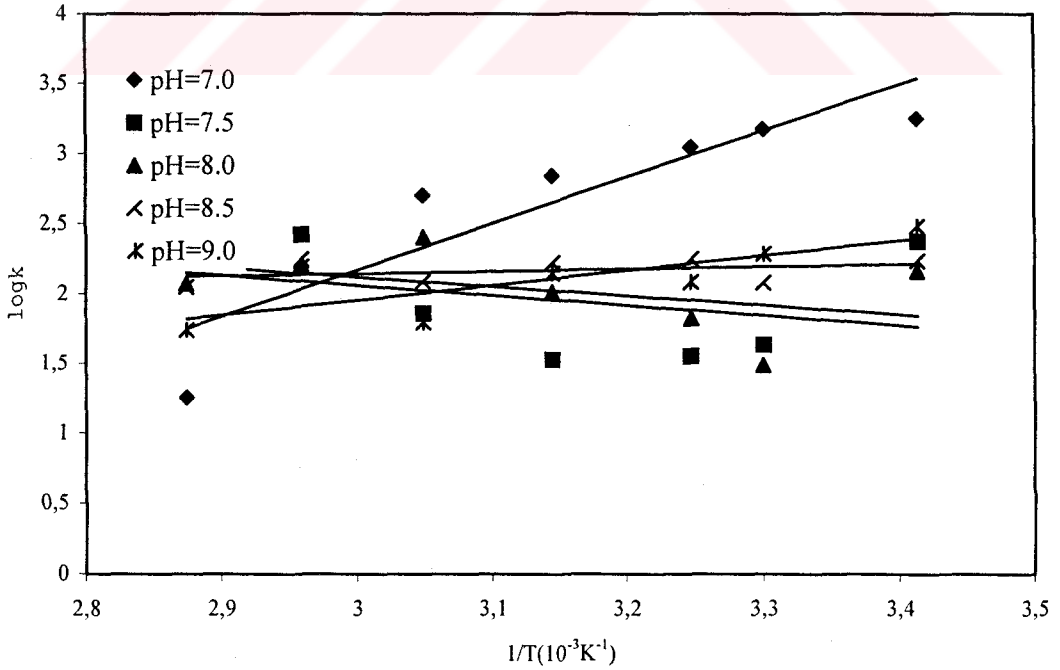
Şekil 3.68 DPPO enziminin pirogallol substratı için değişik sıcaklıklarda pH'ya bağlı aktivite değişimini gösteren grafik

3.4.3 DPPO Enziminin pH'ya Bağımlı Aktivasyon Enerjisinin Değişimi

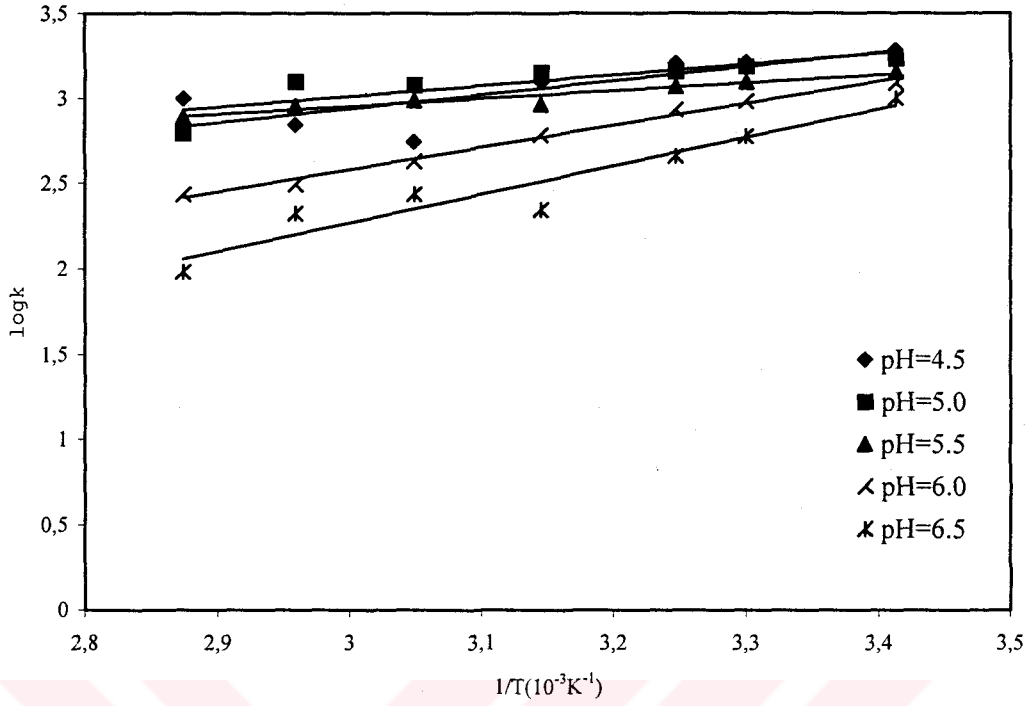
DPPO enziminin aktivasyon enerjisini belirlemek için her bir pH'da ve sıcaklıklarda yapılan çalışmaların aktivite değerlerinden yararlanılarak her bir substratın enzimle olan reaksiyonu için aktivasyon enerjileri bölüm 2.2.8.2'de anlatıldığı gibi hesaplandı. Yapılan optimum pH ve sıcaklık çalışmalarından elde edilen aktivite değerlerinin (U/mLdak) logaritması, reaksiyon sıcaklıklarının ($^{\circ}$ K) tersine ($1/T$) karşı grafiği çizildi. Arrhenius denkleminde yararlanılarak grafiklerin eğiminden ($-E_a/2.303R$) aktivasyon enerjileri hesaplandı. Çizilen grafikler Şekil 3.69-3.74'de, elde edilen aktivasyon enerji değerleri de Çizelge 3.41'de verildi.



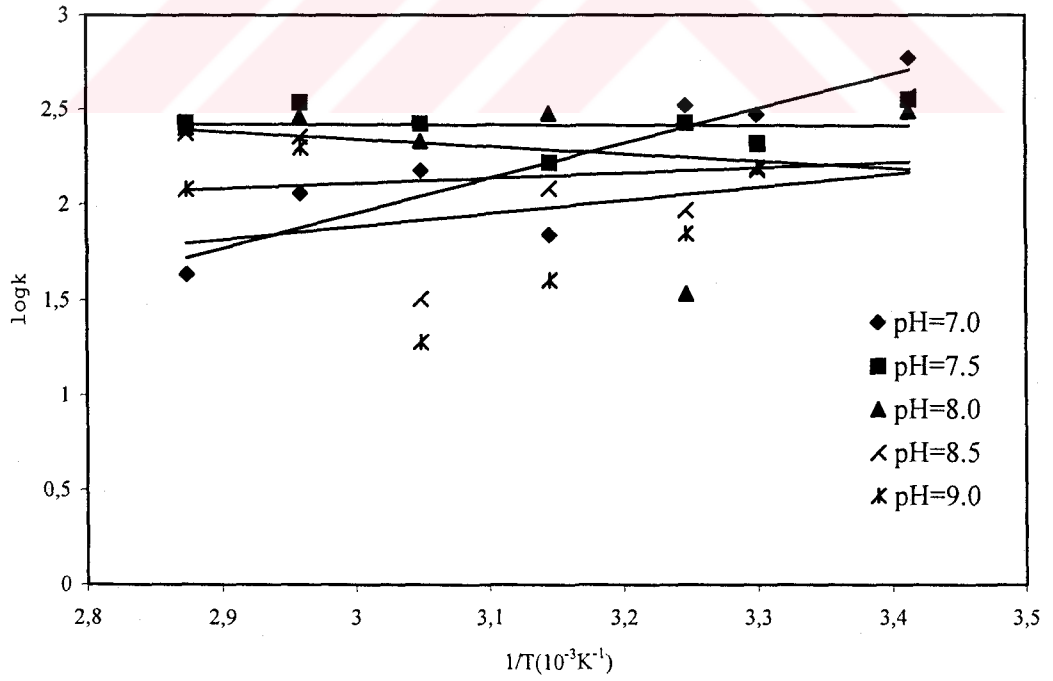
Şekil 3.69 DPPO enzimi için 10 mM katekol substratı ile pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5’da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği



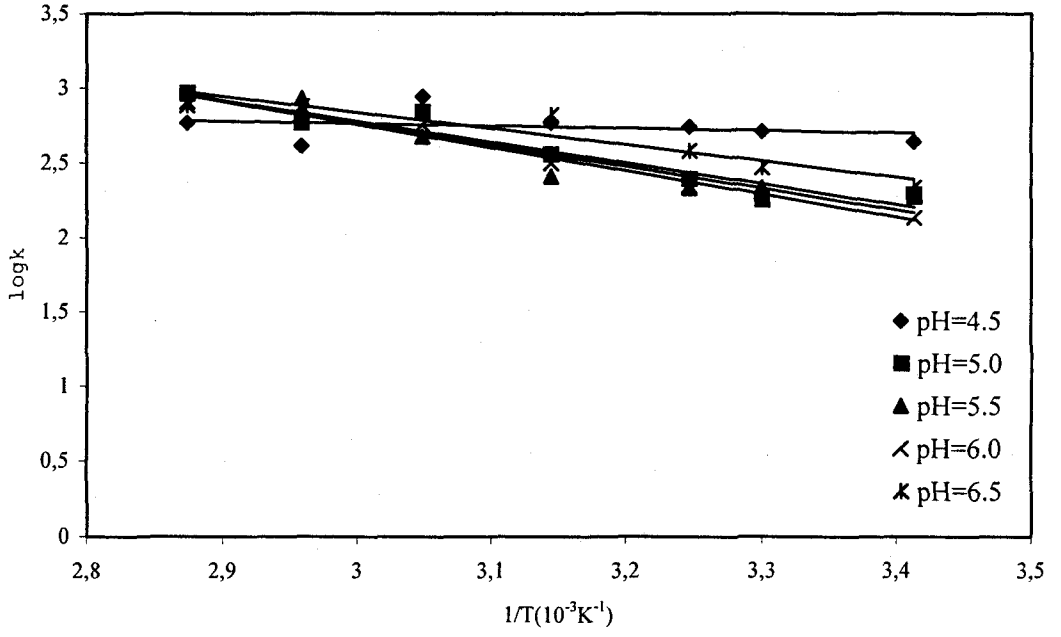
Şekil 3.70 DPPO enzimi için 10 mM katekol substratı ile pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0’da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği



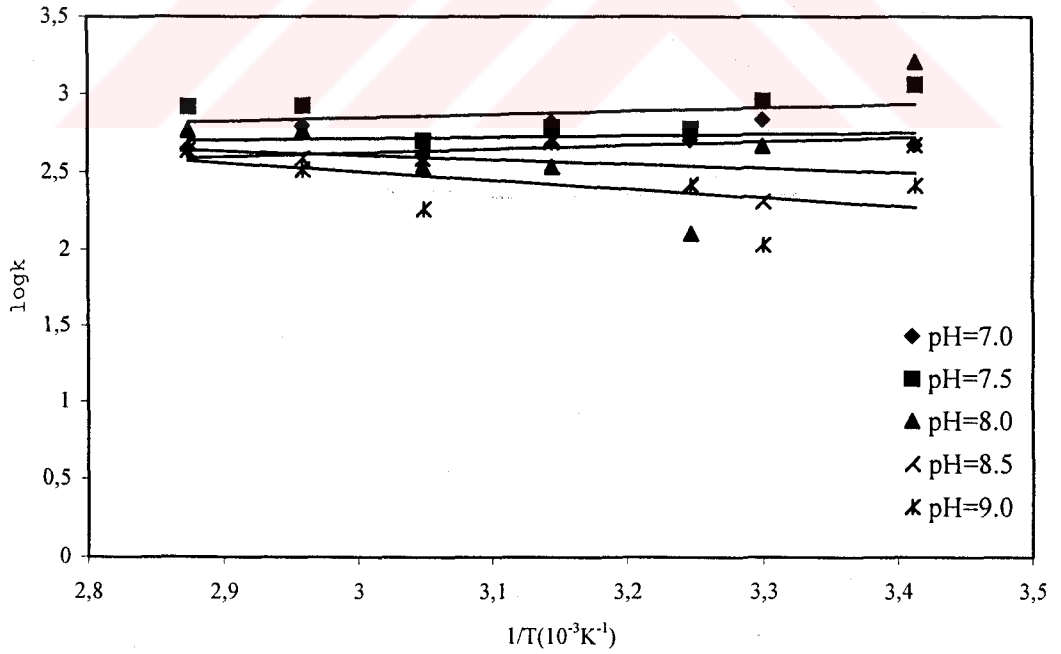
Şekil 3.71 DPPO enzimi için 10 mM 4-metil katekol substratı ile pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği



Şekil 3.72 DPPO enzimi için 10 mM 4-metil katekol substratı ile pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0'da elde edilen $\log k - (1/T)$ grafiği



Şekil 3.73 DPPO enzimi için 10 mM pirogallol substratı ile pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5’da elde edilen logk – (1/T) grafiği



Şekil 3.74 DPPO enzimi için 10 mM pirogallol substratı ile pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0 ’da elde edilen logk – (1/T) grafiği

Çizelge 3.41 DPPO enzimi için değişik pH'larda üç farklı substratı için elde edilen aktivasyon enerjileri

pH	Substrat					
	katekol		4-metil katekol		pirogallol	
	Eğim (-E _A /2.303R)	Aktivasyon Enerjisi (kal mol ⁻¹)	Eğim (-E _A /2.303R)	Aktivasyon Enerjisi (kal mol ⁻¹)	Eğim (-E _A /2.303R)	Aktivasyon Enerjisi (kal mol ⁻¹)
4.5	335.6	-1535.7	822.2	-3762.4	-156.2	714.8
5.0	-320.7	1467.5	624.3	-2856.8	-1398.6	6400.0
5.5	106.0	-485.1	446.3	-2042.3	-1449.7	6633.9
6.0	634.9	-2905.3	1299.3	-5945.7	-1546.7	7077.8
6.5	2324.2	-10635.7	1663.6	-7612.7	-1082.3	4952.7
7.0	3317.6	-15181.5	1836.6	-8404.4	86.2	-394.5
7.5	-710.0	3249.0	-18.0	82.4	208.3	-953.2
8.0	-666.8	3051.3	-385.3	1763.2	235.5	-1077.7
8.5	167.0	-764.2	271.3	-1241.5	-284.4	1301.4
9.0	1065.4	-4875.3	685.7	-3137.8	-565.1	2585.9

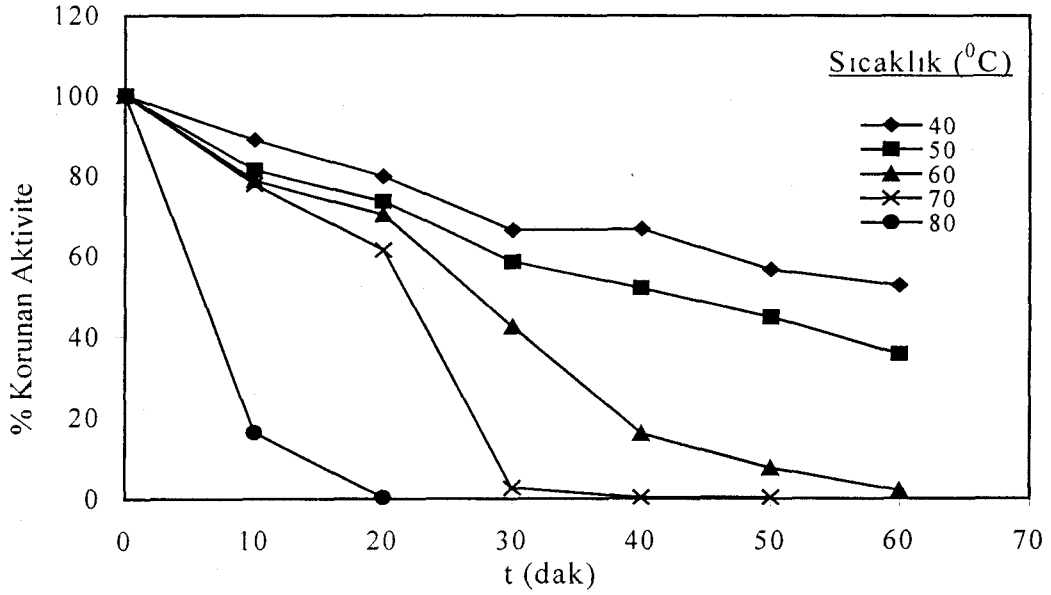
3.4.4 DPPO Enziminin Sıcaklığa Bağımlı Stabilit e  zellikinin Araştırılması

DPPO enziminin sıcaklığa bağımlı denatürasyon  zellikini belirlemek amacıyla; 40, 50, 60, 70 ve 80  C'lerde 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakikalardaki bekleme s releri sonunda aktiviterler saptandı. Elde edilen değerler % aktiviteye d n st r ld  ( izelge 3.42). Zamana karşı % aktivite grafiği  izildi (Şekil 3.75).



Çizelge 3.42 DPPPO enziminin denatürasyon çalışmasının sonuçları

Bekleme Süresi(dak)	Sıcaklık											
	40 °C		50 °C		60 °C		70 °C		80 °C			
	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite		
0	0.3060	100	0.3060	100	0.3060	100	0.3060	100	0.3060	100		
10	0.2720	88.89	0.2490	81.37	0.2410	78.76	0.2380	77.78	0.0500	16.34		
20	0.2440	79.74	0.2250	73.53	0.2150	70.26	0.1880	61.44	0.0010	0.33		
30	0.2030	66.34	0.1790	58.50	0.1300	42.48	0.0080	2.62	-	-		
40	0.2040	66.67	0.1590	51.96	0.0490	16.01	0.0010	0.33	-	-		
50	0.1730	56.54	0.1370	44.77	0.0230	7.52	0.0010	0.33	-	-		
60	0.1610	52.61	0.1090	35.62	0.0060	1.96	-	-	-	-		



Şekil 3.75 DPPO enziminin inkübasyon süresine bağımlı koruduğu aktivite değişimi

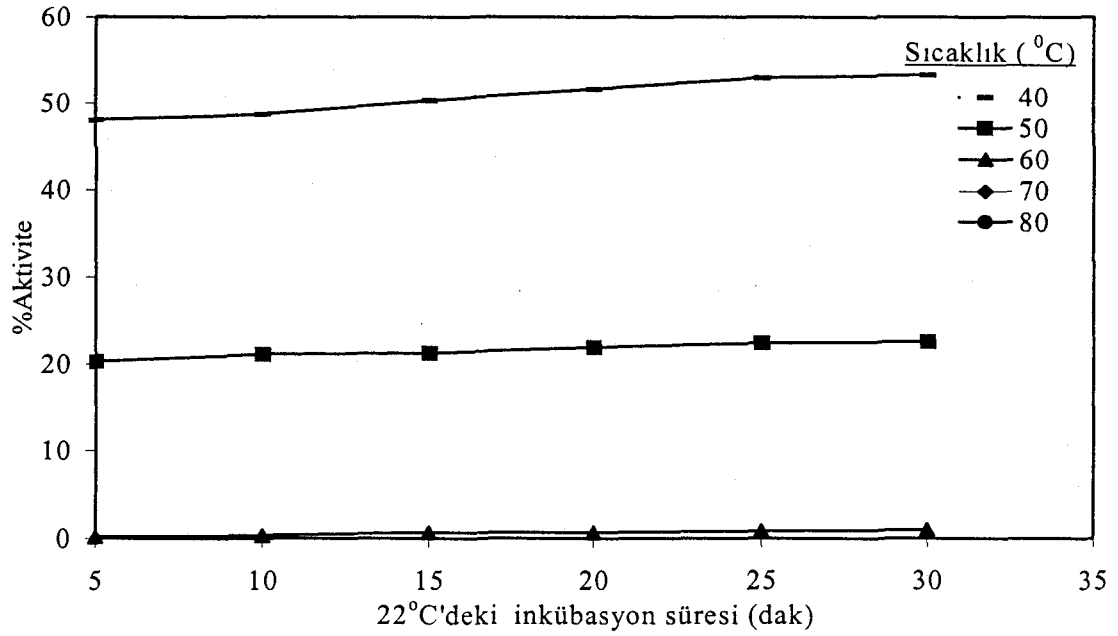
3.4.5 DPPO Enziminin Sıcaklığa Bağımlı Renatürasyon Özelliğinin Araştırılması

DPPO enziminin sıcaklığa bağımlı renatürasyon özelliğinin araştırılması işleminde önce enzimin optimum şartlarda katekol substratı ile aktivitesi ölçüldü ve bu değer % 100 aktivite değeri olarak alındı. 40, 50, 60, 70 ve 80 °C'lerde enzim çözeltisi 1 saat süre ile inkübe edildi. Çalışılan bütün sıcaklıklarda, 1 saatin sonunda enzim çözeltisinin sıcaklığı 22 °C'ye düşürüldü ve bu sıcaklıkta 5, 10, 15, 20, 25 ve 30'uncu dakikalarda aktiviteler belirlendi. Elde edilen aktivite değerleri % aktiviteye dönüştürüldü (Çizelge 3.43). % Aktiviteye karşı 22 °C'deki inkübasyon süresi grafiği çizildi (Şekil 3.76).

Çizelge 3.43 DPPO enziminin renatürasyon çalışmasının sonuçları

22 °C'de bekleme süresi(dak)	Sıcaklık											
	40 °C		50 °C		60 °C		70 °C		80 °C		% Aktivite	
	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite	ΔOD (420 nm)	%Aktivite		
5	0.1470	48.04	0.0620	20.26	0.0005	0.16	-	-	-	-	-	
10	0.1490	48.69	0.0645	21.08	0.0010	0.33	-	-	-	-	-	
15	0.1540	50.33	0.0650	21.24	0.0020	0.65	-	-	-	-	-	
20	0.1580	51.63	0.0670	21.89	0.0020	0.65	-	-	-	-	-	
25	0.1620	52.94	0.0685	22.39	0.0025	0.82	-	-	-	-	-	
30	0.1630	53.27	0.0690	22.55	0.0030	0.98	-	-	-	-	-	

Not:Deneye başlamadan önce 420 nm'de 22 °C'de aktivite 0.3060 olarak bulundu ve %aktivite değerleri bu değere göre hesaplandı.



Şekil 3.76 DPPO enziminin sıcaklığının çalışılan sıcaklıktan 22 °C'ye düşürülmesi üzerine, 10 mM katekol substratı kullanarak, elde edilen inkübasyon süresine karşı % aktivite grafiği

3.4.6 DPPO Enziminin Farklı Substratları İçin Optimum Şartlarda K_M ve V_{max} Değerlerinin Bulunması

K_M ve V_{max} değerlerinin tespit edilmesi amacıyla, optimum şartlarda katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratlarının değişen konsantrasyonlarında enzim aktivitesi ölçümleri yapıldı. Her ölçüm iki defa tekrarlanarak, bulunan değerlerin ortalaması alındı. 420 nm'de ölçülen aktivite değerleri reaksiyon hızı (U/mLdak) olarak alındı.

$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak (Çizelge 3.44-3.46) her bir substrat için Linewear-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.77-3.79). K_M ve V_{max} değerleri grafiklerden yararlanarak doğru denklemleri kullanılarak bulundu. Bulunan K_M , V_{max} ve V_{max}/K_M değerleri Çizelge 3.47'de verildi.

Çizelge 3.44 DPPO enziminin, katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

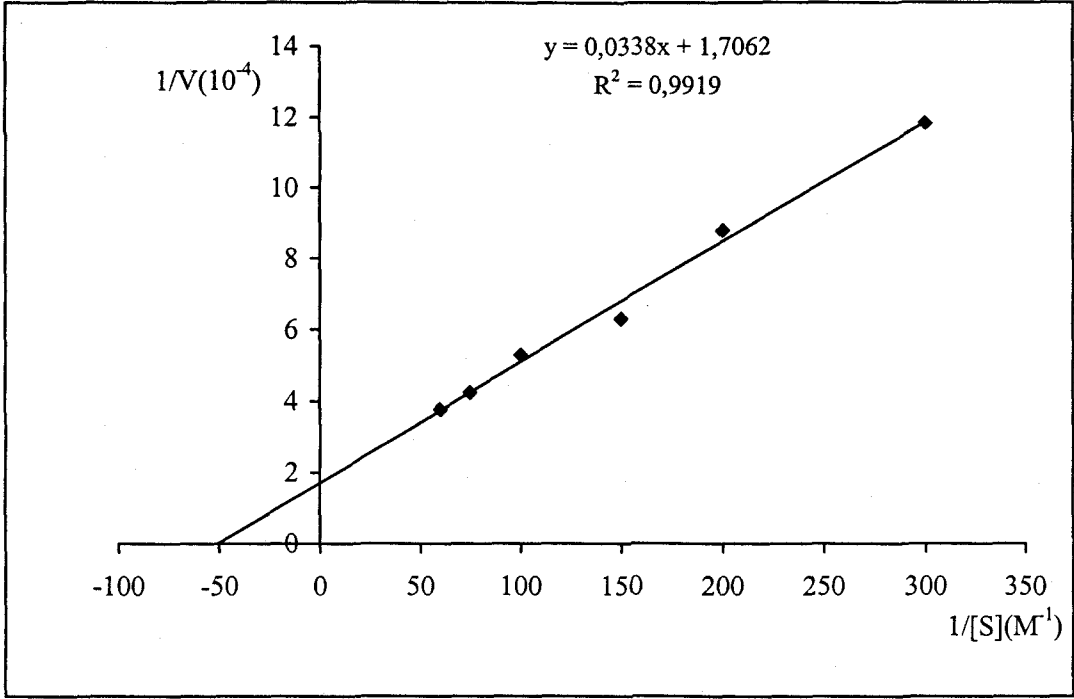
0.1M sitrat/0.2 M Na_2HPO_4 tamponu (mL)	Enzim çözeltisi hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2.7	0.2	0.10	3	3.33	0.1690	169	845	11.830	300
2.7		0.15		5	0.2277	227.7	1139	8.779	200
2.6		0.20		6.67	0.3185	318.5	1593	6.277	150
2.5		0.30		10.00	0.3791	379.1	1896	5.274	100
2.4		0.40		13.33	0.4713	471.3	2357	4.243	75
2.3	0.50	16.67	0.5310	16.67	531	2655	3.766	60	

Çizelge 3.45 DPPPO enziminin, 4-metil katekol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

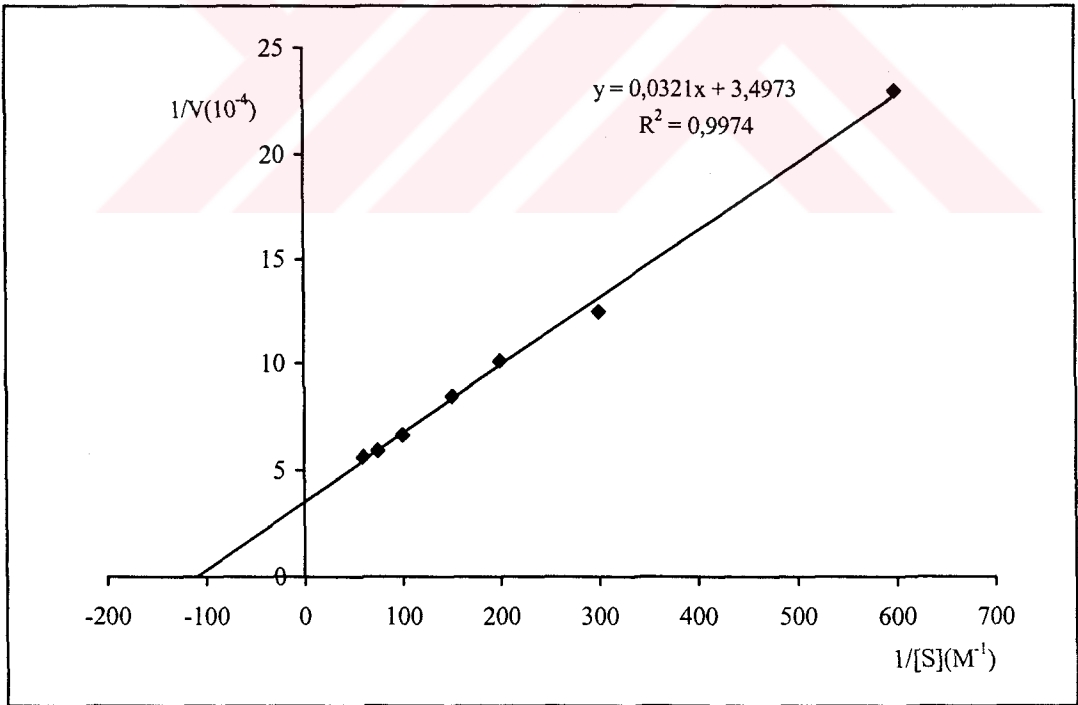
0.1M sitrat/0.2 M Na_2HPO_4 tamponu (mL))	Enzim çözeltisi hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2.8	0.2	0.05	3	1.67	0.0870	87	435	22.990	600
2.7		0.10		3.33	0.1603	160.3	801.5	12.480	300
2.6		0.15		5	0.1980	198	990	10.100	200
2.6		0.20		6.67	0.2366	236.6	1183	8.453	150
2.5		0.30		10	0.3020	302	1510	6.623	100
2.4		0.40		13.33	0.3388	338.8	1694	5.903	75
2.3	0.50	16.67	0.3560	356	1780	5.618	60		

Çizelge 3.46 DPPPO enziminin, pirogallol substratı kullanarak, K_M ve V_{max} değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, U, aktivite, $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri

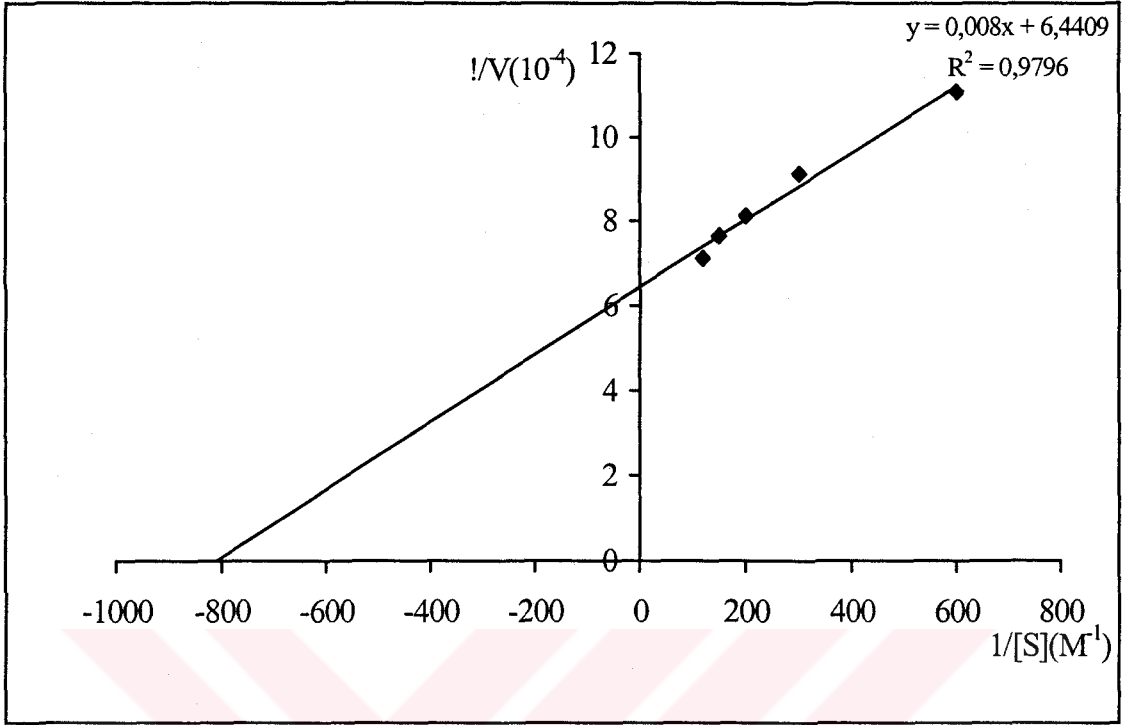
0.2M Tris Tamponu (mL)	Enzim çözeltisi hacmi (mL)	Substrat çözeltisi hacmi (mL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	AOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2.8	0.2	0.05	3	1.67	0.1805	180.5	902.5	11.08	600
2.7		0.10		3.33	0.2188	218.8	10.94	9.14	300
2.6		0.15		5	0.2464	246.4	1232	8.12	200
2.6		0.20		6.67	0.2618	261.8	1309	7.64	150
2.6		0.25		8.33	0.2808	280.8	1404	7.12	120



Şekil 3.77 DPPO enzimi için katekol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.78 DPPO enzimi için 4-metil katekol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 3.79 DPPO enzimi için pirogallol substratı ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 3.47 DPPO enziminin üç farklı substratı için K_M ve V_{max} değerleri

Substrat	$K_M(mM)$	$V_{max}(U/mLdak)$	V_{max}/ K_M
katekol	19.81	5860.98	295.9×10^3
4-metil katekol	9.18	2859.35	311.5×10^3
pirogallol	1.24	1552.58	1252.1×10^3

3.4.7 DPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin I_{50} Değerlerinin Bulunması

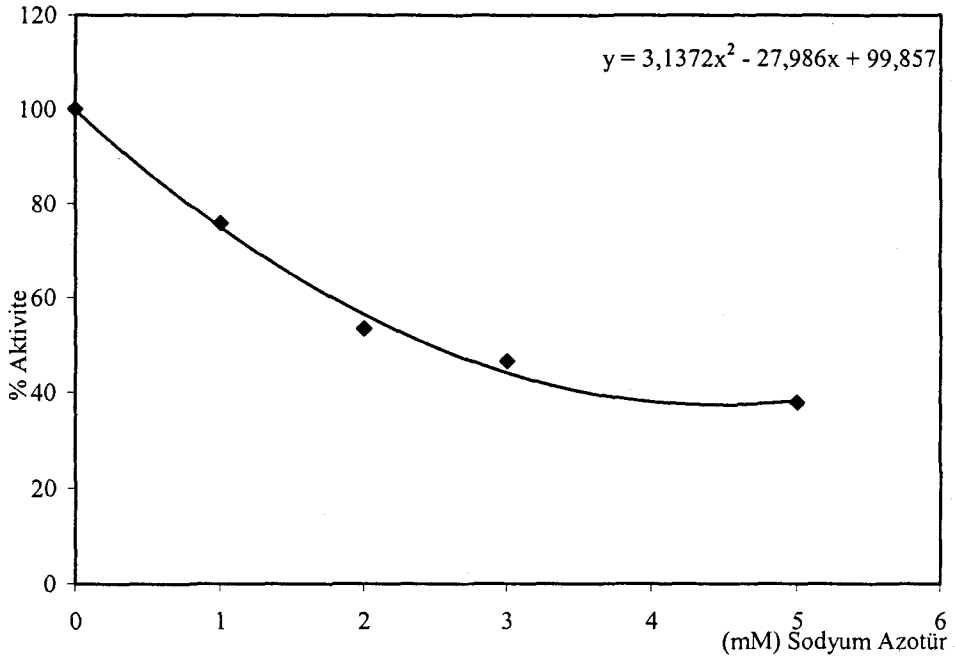
Bu çalışmamızda kullandığımız inhibitörlerin I_{50} değerlerini bulmak için, optimum şartlarda katekol substratının 10 mM sabit konsantrasyonunda çalışıldı. Substrat çözeltisi olarak 0.1 M katekol hazırlandı ve her ölçümde 0.3 mL alındı.

İnhibitör çözeltilerinden ise değişen hacimlerde alınarak toplam 3 mL'lik bir reaksiyon hacmi oluşturuldu. Önce inhibitörsüz ortamda enzim aktivitesi bulundu. Bu değer % 100 aktivite olarak kullanıldı. Daha sonra optimum pH ve sıcaklıkta 0.2 mL enzim çözeltilisi alınıp daha önceden hazırlanmış olan 2.8 mL tampon + substrat + inhibitör çözeltilisine çabuk bir şekilde eklendikten sonra 420 nm'de bir dakikada absorbansda meydana gelen değişme okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden % aktiviteler hesaplandı (Çizelge 3.48-3.53). % Aktivite-[I] grafikleri çizildi (Şekil 3.80-3.91). (I= küvetteki 3 mL hacim içerisinde bulunan inhibitör konsantrasyonudur). Bu grafiklerden yararlanarak her bir inhibitör için I_{50} değerleri hesaplandı. Sonuçlar Çizelge 3.54'de verildi.

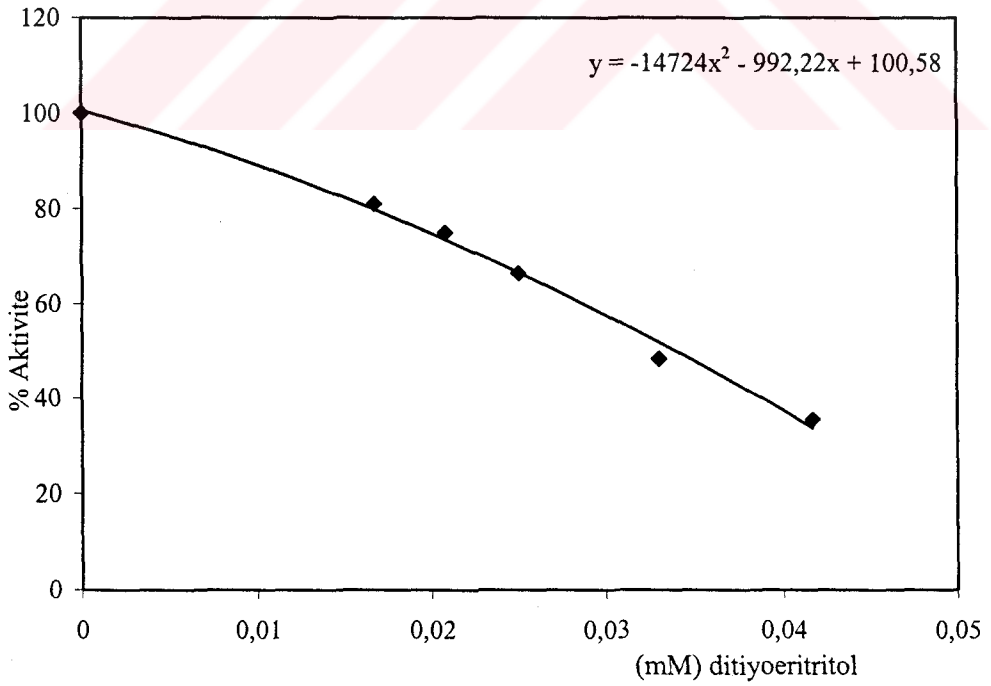


Çizelge 3.48 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sodyum azid ve ditiyoeritritol'ün, I₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.1M sitrat/0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (µL)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat çözeltisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki inhibitör Kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
2500	<i>sodyum azid</i>	200	300	-	-	0.2320	232	1160	100
2495				5	1.0	0.1760	176	880	75.86
2490				10	2.0	0.1240	124	620	53.45
2485				15	3.0	0.1080	108	540	46.55
2475				25	5.0	0.0880	88	440	37.93
2450				50	10.0	0.0780	78	390	33.62
2500	<i>ditiyoeritritol</i>	200	300	-	-	0.2320	232	1160	100
2460				40	0.0167	0.1880	188	940	81.03
2450				50	0.0208	0.1740	174	870	75.00
2440				60	0.0250	0.1540	154	770	66.38
2420				80	0.0333	0.1120	112	560	48.28
2400				100	0.0417	0.0820	82	410	35.34



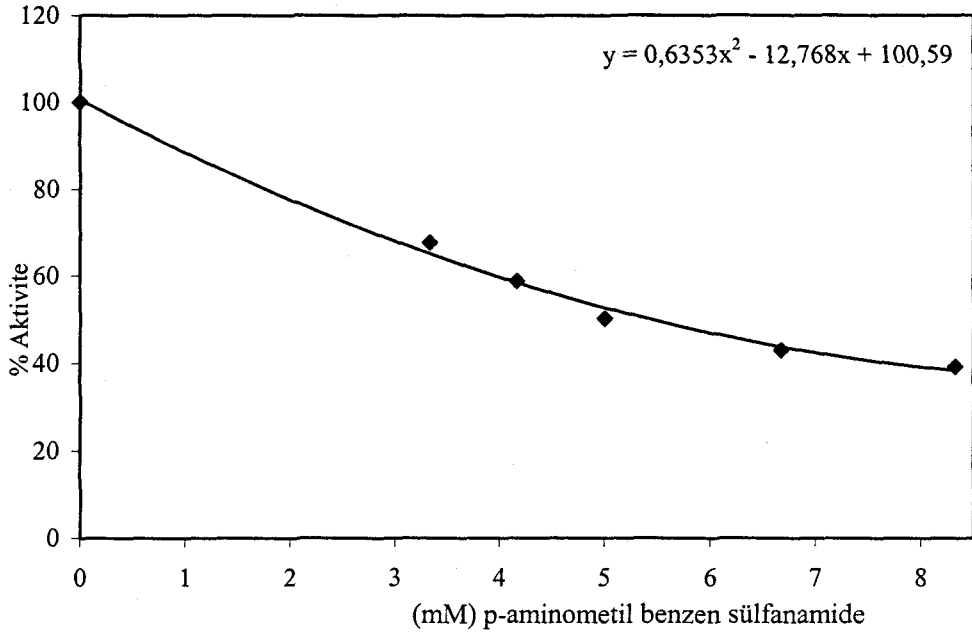
Şekil 3.80 DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda sodyum azid için % aktivite-[I] grafiği



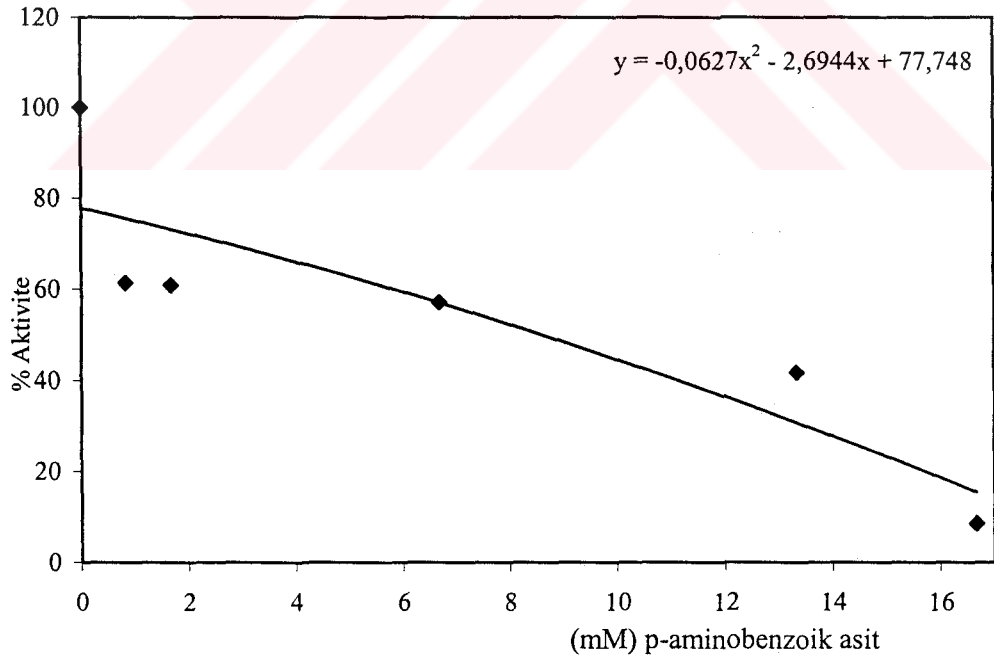
Şekil 3.81 DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda ditiyoeritritol için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.49 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren p-amino metil benzen sülfanamid ve p-aminobenzoik asidin, I₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.1M sitrat/0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (µL)	Inhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat çözeltisi hacmi (µL)	Inhibitör çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki inhibitör Kons. [I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
2500	<i>p-amino metil benzen sülfanamid</i>	200	300	-	-	0.2350	235	1175	100
2400				100	3.33	0.1590	159	795	67.66
2375				125	4.17	0.1380	138	690	58.72
2350				150	5.00	0.1180	118	590	50.21
2300				200	6.67	0.1010	101	505	42.98
2250				250	8.33	0.0920	92	460	39.15
2500	<i>p-amino benzoik asit</i>	200	300	-	-	0.2350	235	1175	100
2450				50	0.83	0.1440	144	720	61.28
2400				100	1.67	0.1430	143	715	60.85
2100				400	6.67	0.1340	134	670	57.02
1700				800	13.33	0.0980	98	490	41.70
1500				1000	16.67	0.0200	20	100	8.51



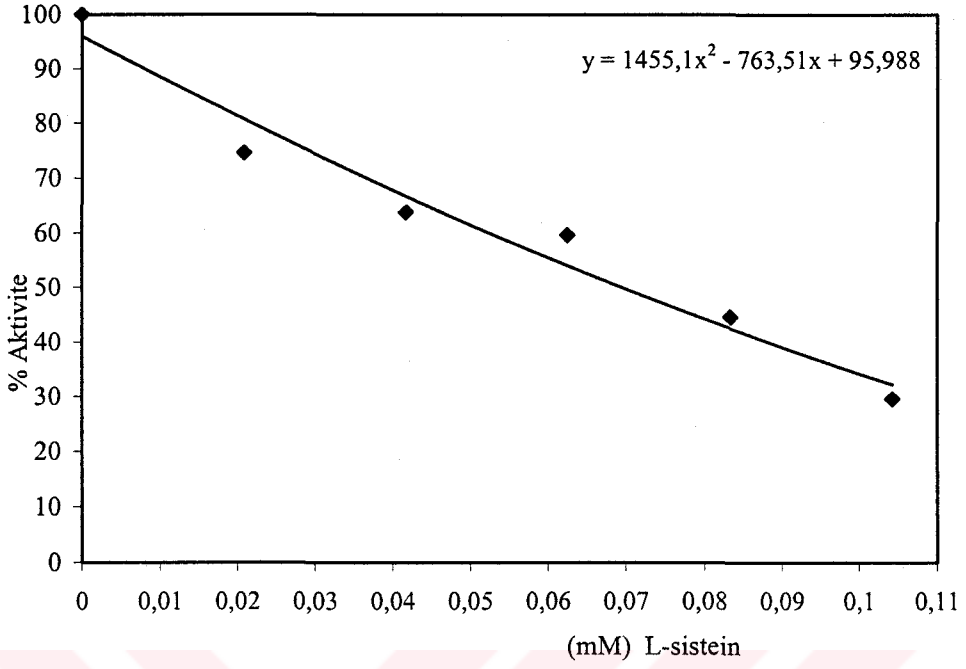
Şekil 3.82 DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda p-aminometil benzen sülfanamid için % aktivite-[I] grafiği



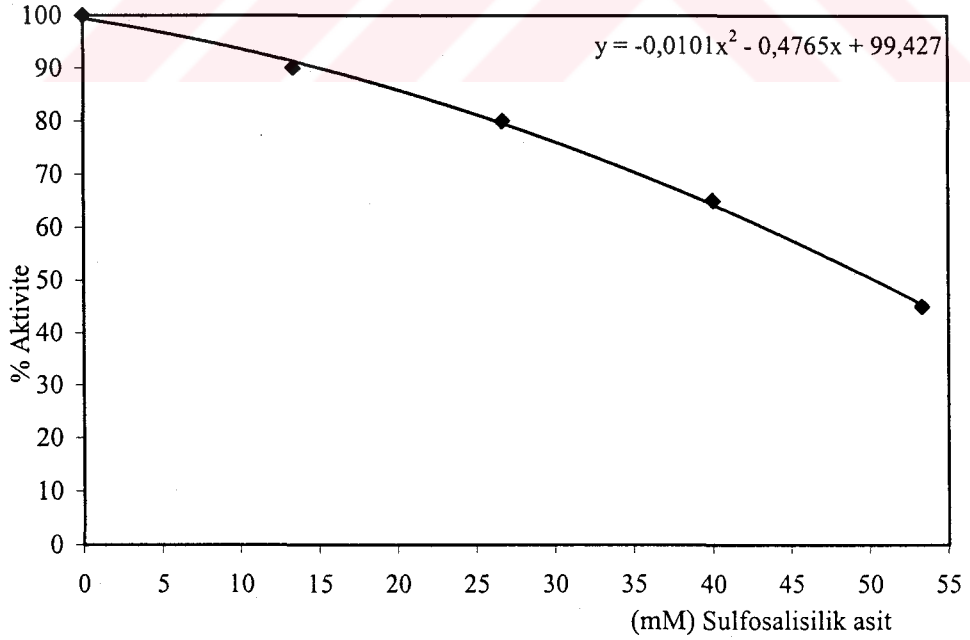
Şekil 3.83 DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda p-aminobenzoik asit için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.50 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L-sistein ve sulfosalisilik asidin, I₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.1M sitrat/0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (µL)	Inhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat çözeltisi hacmi (µL)	Inhibitör çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki inhibitör Kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
2500	L-sistein	200	300	-	-	0.2400	240	1200	100
2475				25	0.0208	0.1790	179	895	74.58
2450				50	0.0417	0.1530	153	765	63.75
2425				75	0.0625	0.1430	143	715	59.58
2400				100	0.0833	0.1070	107	535	44.58
2375				125	0.0104	0.0710	71	355	29.58
2500				-	-	-	-	0.2400	240
2300	Sulfosalisilik asit	200	300	200	13.33	0.2160	216	1080	90.00
2100				400	26.67	0.1920	192	960	80.00
1900				600	40.00	0.1560	156	780	65.00
1700				800	53.33	0.1080	108	540	45.00



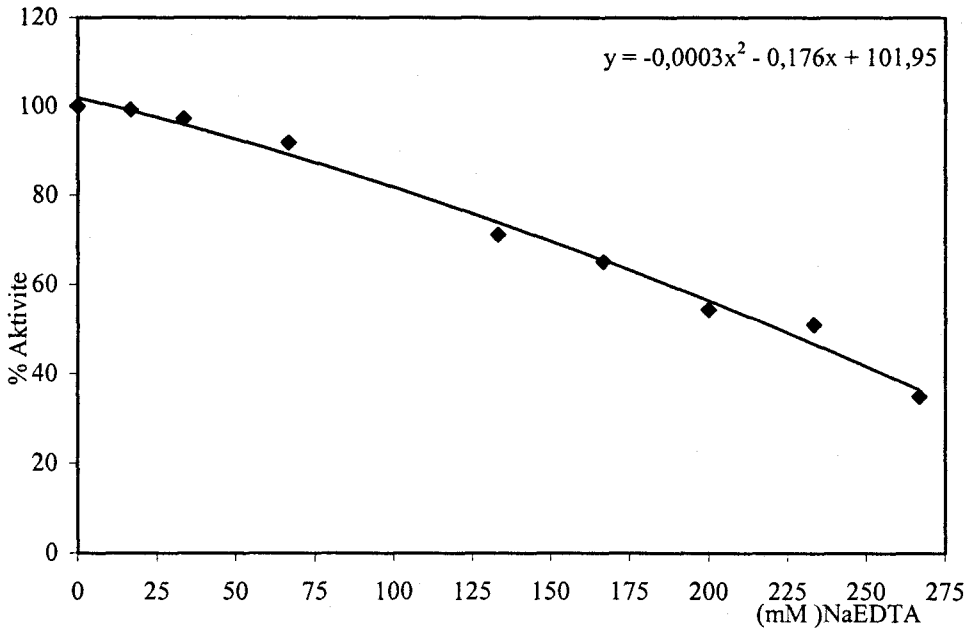
Şekil 3.84 DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda L-sistein için % aktivite-[I] grafiği



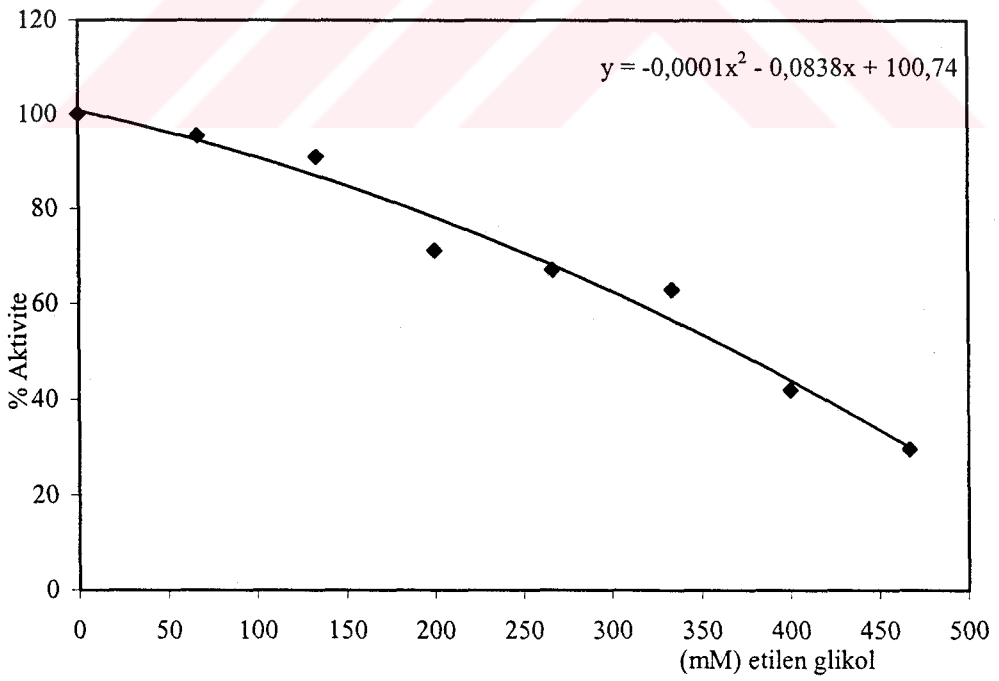
Şekil 3.85 DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda sulfosalisilik asit için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.51 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren NaEDTA ve etilen glikolün, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

00.1M sitrat/0.2M Na_2HPO_4 tamponu (μL)	Inhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (μL)	Substrat çözeltisi hacmi (μL)	Inhibitör çözeltisi hacmi (μL)	Küvetteki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
2500	NaEDTA	200	300	-	-	0.2430	243	1215	100
2400				100	16.67	0.2410	241	1205	99.18
2300				200	33.33	0.2360	236	1180	97.12
2100				400	66.67	0.2230	223	1115	91.77
1700				800	133.33	0.1730	173	865	71.19
1500				1000	166.67	0.1580	158	790	65.02
1300				1200	200.00	0.1320	132	660	54.32
1100				1400	233.33	0.1240	124	620	51.03
900				1600	266.67	0.0850	85	425	34.98
2700				etilen glikol	100	300	-	-	0.2430
2400	200	66.67	0.2320				232	2320	95.47
2200	400	133.33	0.210				221	2210	90.95
2000	600	200.00	0.1730				173	1730	71.19
1800	800	266.67	0.1630				163	1630	67.08
1600	1000	333.33	0.1530				153	1530	62.96
1400	1200	400.00	0.1020				102	1020	41.98
1200	1400	466.67	0.0720				72	720	29.63



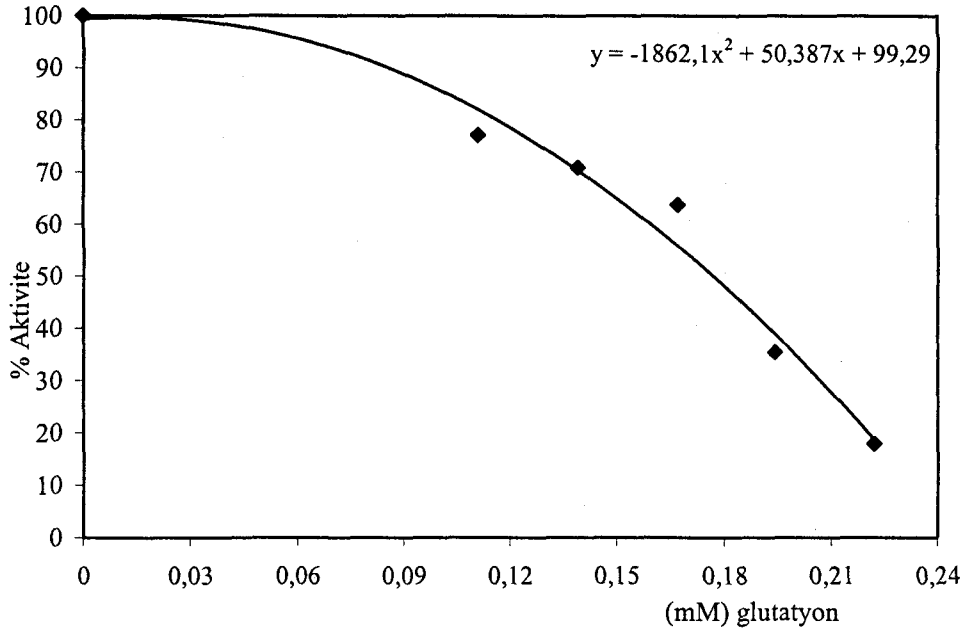
Şekil 3.86 DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda NaEDTA için % aktivite-[I] grafiği



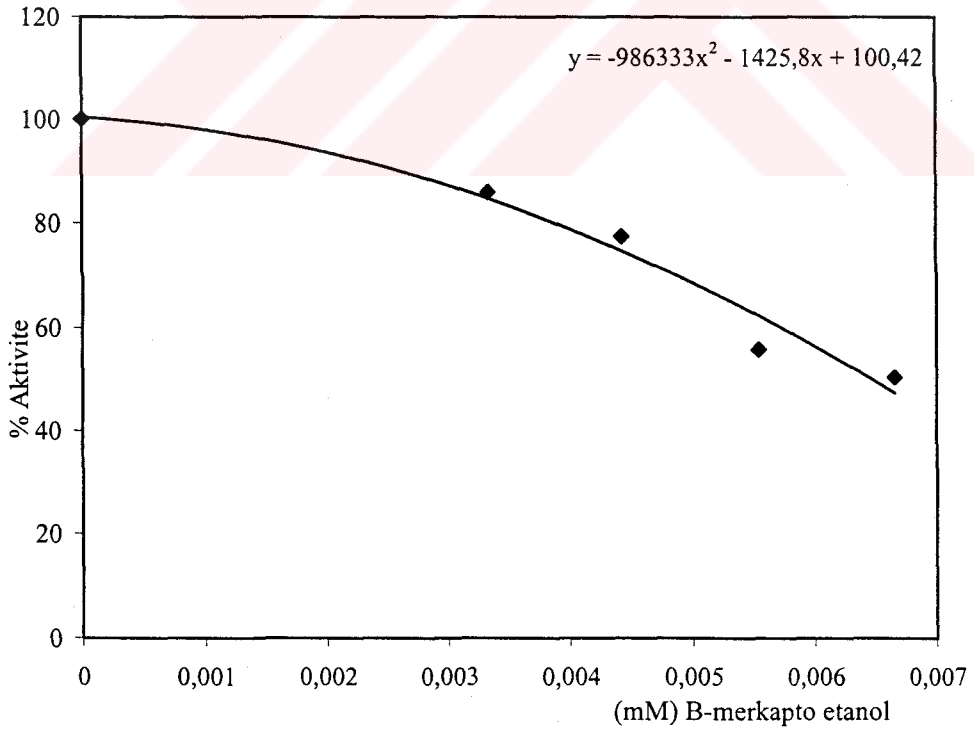
Şekil 3.87 DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda etilen glikol için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.52 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glutatyon ve β -merkaptto etanol'ün, I_{50} değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.1M sitrat/0.2M Na_2HPO_4 tamponu (μ L)	Inhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (μ L)	Substrat çözeltisi hacmi (μ L)	Inhibitör çözeltisi hacmi (μ L)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (mM)	Δ OD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
2500	glutatyon	200	300	-	-	0.2400	240	1200	100
2400				100	0.111	0.1850	185	925	77.08
2375				125	0.139	0.1700	170	850	70.83
2350				150	0.167	0.1530	153	765	63.75
2325				175	0.194	0.0850	85	425	35.42
2300				200	0.222	0.0430	43	215	17.92
2500	β -merkaptto etanol	200	300	-	-	0.2350	235	1175	100
2425				75	0.00233	0.2020	202	1010	85.96
2400				100	0.00443	0.1820	182	910	77.45
2375				125	0.00554	0.1310	131	655	55.74
2350				150	0.00665	0.760	76	380	32.34



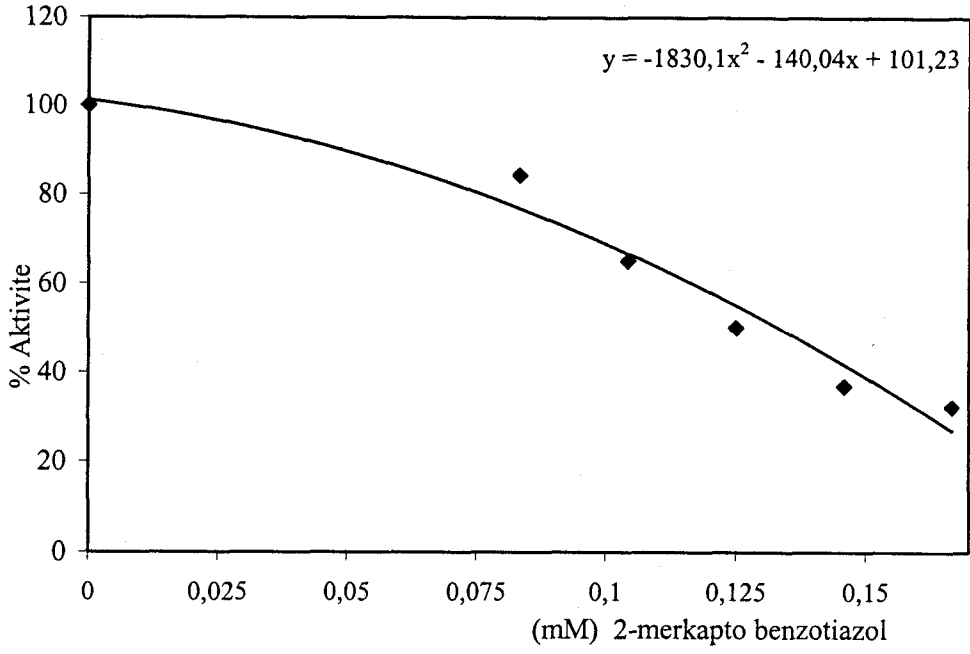
Şekil 3.88 DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda glutatyon için % aktivite-[I] grafiği



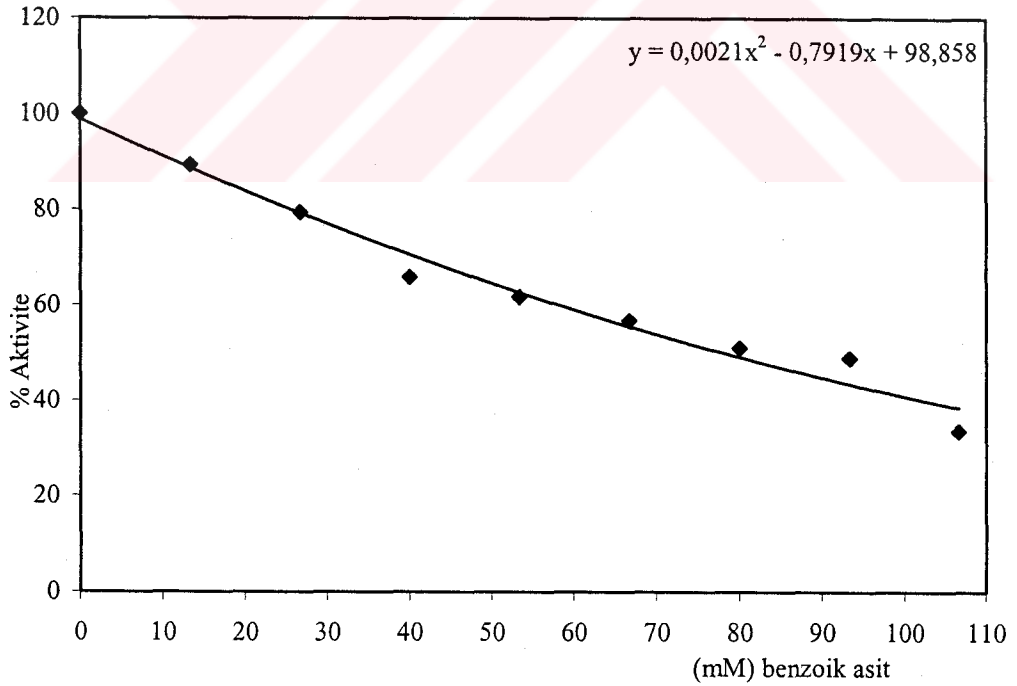
Şekil 3.89 DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda β -merkpto etanol için %aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.53 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 2-merkaptobenzotiyazol ve benzoik asidin, I₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.1M sitrat/0.2M Na ₂ HPO ₄ tamponu (µL)	İnhibitör	Enzim çözeltisi hacmi (µL)	Substrat çözeltisi hacmi (µL)	İnhibitör çözeltisi hacmi (µL)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	% Aktivite
2500	<i>2-merkaptobenzotiyazol</i>	200	300	-	-	0.2350	235	1175	100
2400				100	0.0833	0.1980	198	990	84.26
2375				125	0.1042	0.1530	153	765	65.11
2350				150	0.1250	0.1180	118	590	50.21
2325				175	0.1458	0.0870	87	435	37.02
2300				200	0.1667	0.0760	76	380	32.34
2500	<i>benzoik asit</i>	200	300	-	-	0.2430	243	1215	100
2300				200	13.33	0.2170	217	1085	89.30
2100				400	26.67	0.1930	193	965	79.42
1900				600	40.00	0.1600	160	800	65.84
1700				800	53.33	0.1500	150	750	61.73
1500				1000	66.67	0.1380	138	690	56.79
1300				1200	80.00	0.1240	124	620	51.03
1100				1400	93.33	0.1190	119	595	48.97
900	1600	106.67	0.0820	82	410	33.74			



Şekil 3.90 DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda 2-merkapto-benzotiazol için % aktivite-[I] grafiği



Şekil 3.91 DPPO enzimi üzerine 10 mM katekol substratı konsantrasyonunda benzoik asit için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 3.54 DPPO enzimi için 10 mM katekol substrat konsantrasyonunda % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonları

İnhibitör	I₅₀(mM)
β-merkpto etanol	0.0065
Ditiyoeritritol	0.0339
L-sistein	0.0694
2-merkpto benzotiazol	0.133
Glutatyon	0.177
Sodyum Azid	2.46
p-amino metil benzen sülfanamid	5.43
p-aminobenzoik asit	8.59
Sulfosalisilik asit	50.22
Benzoik asit	77.71
NaEDTA	215.00
Etilen glikol	407.50

3.4.8 DPPO Enziminin Farklı İnhibitörleri İçin K_i Sabitlerinin Bulunması

Farklı inhibitörlerin K_i sabitlerinin bulunması amacıyla, önce inhibitörsüz ortamda optimum şartlarda beş farklı katekol substratı konsantrasyonuna bağlı olarak aktiviteler bulundu. Daha sonra her bir inhibitör için 3 değişik sabit inhibitör konsantrasyonunda, standart aktivite ölçüm koşullarında, katekol substratı kullanılarak aktiviteler belirlendi (Çizelge 3.55 – 3.63). $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak, Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 3.92–3.100). Bu grafiklerden yararlanarak K_i değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi (Çizelge 3.64). K_i değerleri bölüm 2.2.8.6’da anlatıldığı gibi bulundu.

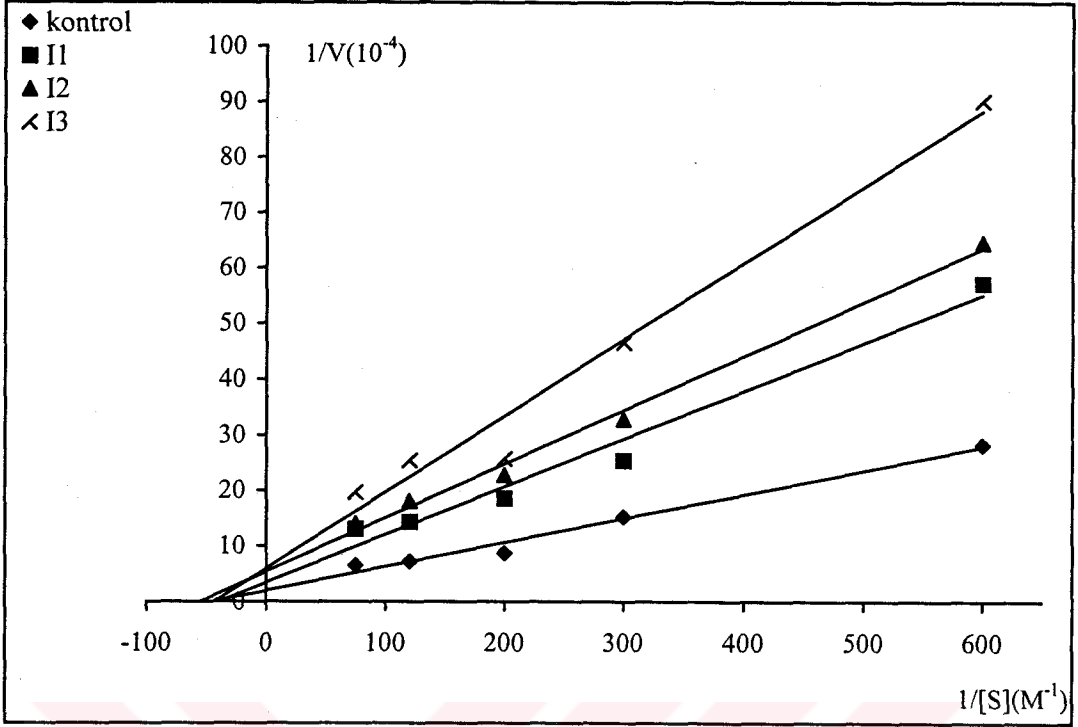


Çizelge 3.55 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sodyum azid'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

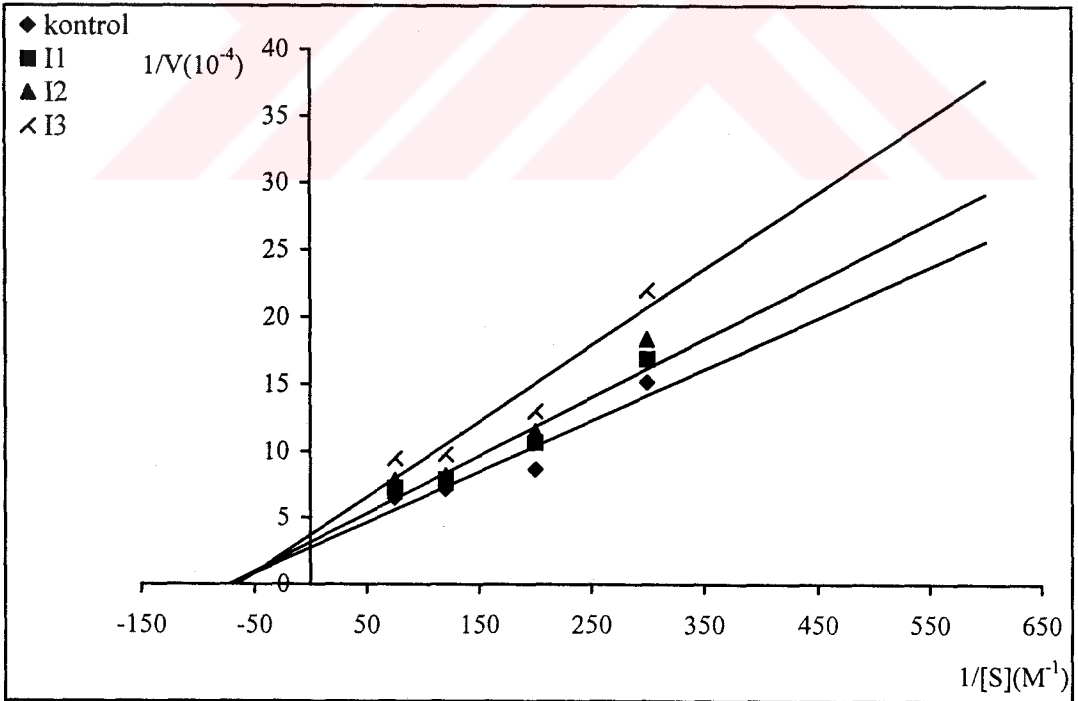
0.1M sitrat/0.2 M Na_2HPO_4 tamponu (μL)	Enzim çözeltisi hacmi (μL)	Substrat çözeltisi hacmi (μL)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔOD (420nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2750		50	-	3	1.67	-	0.0710	71	355	28.17	600
2700		100	-		3.33	-	0.1320	132	660	15.15	300
2650		150	-		5	-	0.2320	232	1160	8.62	200
2550		250	-		8.33	-	0.2800	280	1400	7.14	120
2400		400	-		13.33	-	0.3090	309	1545	6.47	75
2735		50	15		1.67	3.0	0.0350	35	175	57.14	600
2685		100	15		3.33	3.0	0.0790	79	395	25.32	300
2635		150	15		5	3.0	0.1080	108	540	18.52	200
2535		250	15		8.33	3.0	0.1400	140	700	14.29	120
2385	200	400	15		13.33	3.0	0.1530	153	765	13.07	75
2725		50	25		1.67	5.0	0.0310	31	155	6.452	600
2675		100	25		3.33	5.0	0.0610	61	305	32.79	300
2625		150	25		5	5.0	0.0880	88	440	22.73	200
2525		250	25		8.33	5.0	0.1110	111	555	18.02	120
2375		400	25		13.33	5.0	0.1430	143	715	13.97	75
2700		50	50		1.67	10.0	0.0220	22	110	91.00	600
2650		100	50	3.33	10.0	0.0430	43	215	46.51	300	
2600		150	50	5	10.0	0.0780	78	390	25.64	200	
2500		250	50	8.33	10.0	0.0790	79	395	25.32	120	
2350		400	50	13.33	10.0	0.1020	102	510	19.61	75	

Çizelge 3.56 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren ditiyoeritrol'ün, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.1M sitrat/0.2 M Na_2HPO_4 tamponu (μL)	Enzim çözeltisi hacmi (μL)	Substrat çözeltisi hacmi (μL)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons. [S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons. [I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2750		50	-	3	1.67	-	0.0710	71	355	28.17	600
2700		100	-		3.33	-	0.1320	132	660	15.15	300
2650		150	-		5	-	0.2320	232	1160	8.62	200
2550		250	-		8.33	-	0.2800	280	1400	7.14	120
2400		400	-		13.33	-	0.3090	309	1545	6.47	75
2710	200	50	40		1.67	0.0167	0.0570	57	285	35.09	600
2660		100	40		3.33	0.0167	0.1190	119	595	16.81	300
2610		150	40		5	0.0167	0.1880	188	940	10.64	200
2510		250	40		8.33	0.0167	0.2540	254	1270	7.87	120
2360		400	40		13.33	0.0167	0.2760	276	1380	7.25	75
2700		50	50		1.67	0.0208	0.0490	49	245	40.82	600
2650		100	50		3.33	0.0208	0.1090	109	545	18.35	300
2400		150	50		5	0.0208	0.1740	174	870	11.49	200
2500		250	50		8.33	0.0208	0.2450	245	1225	8.16	120
2350		400	50		13.33	0.0208	0.2560	256	1280	7.81	75
2690		50	60		1.67	0.0250	0.0200	20	100	100.0	600
2640		100	60	3.33	0.0250	0.0910	91	455	21.98	300	
2590		150	60	5	0.0250	0.1540	154	770	12.99	200	
2490		250	60	8.33	0.0250	0.2050	205	1025	9.76	120	
2340		400	60	13.33	0.0250	0.2120	212	1060	9.43	75	



Şekil 3.92 DPPO enzimi aktivitesi üzerine sodyum azid'in inhibisyon etkisi. $[I_1]=3.0 \times 10^{-3}$ M, $[I_2]=5.0 \times 10^{-3}$ M, $[I_3]=10.0 \times 10^{-3}$ M



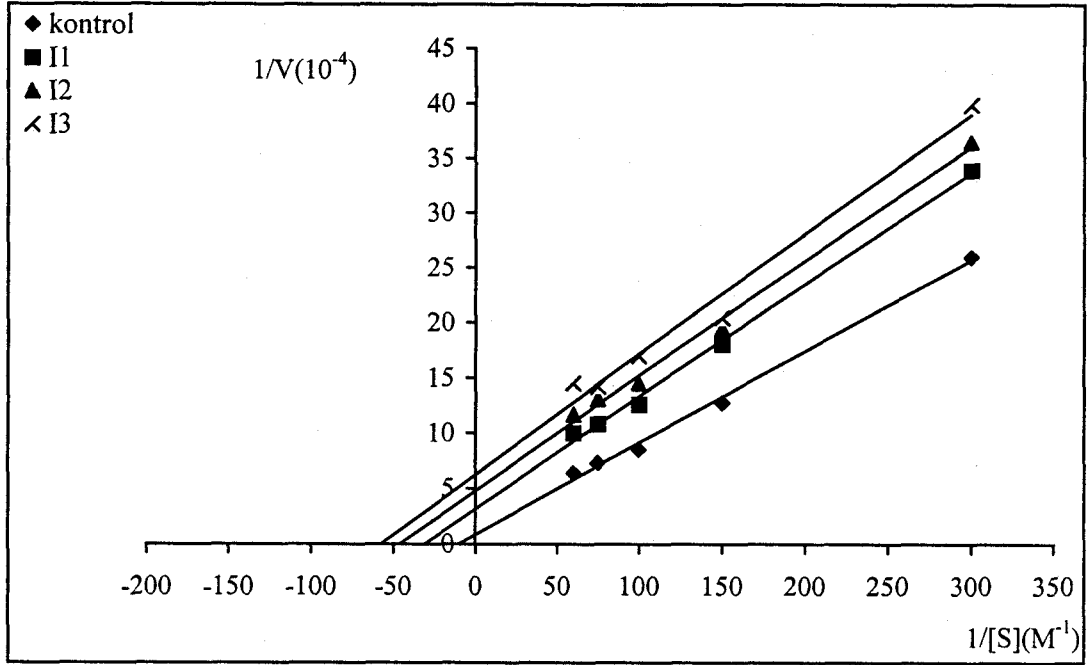
Şekil 3.93 DPPO enzimi aktivitesi üzerine ditiyoeritritol'ün inhibisyon etkisi. $[I_1]=1.67 \times 10^{-5}$ M, $[I_2]=2.08 \times 10^{-5}$ M, $[I_3]=2.50 \times 10^{-5}$ M

Çizelge 3.57 DPPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren p-amino metil benzen sülfanamidin, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

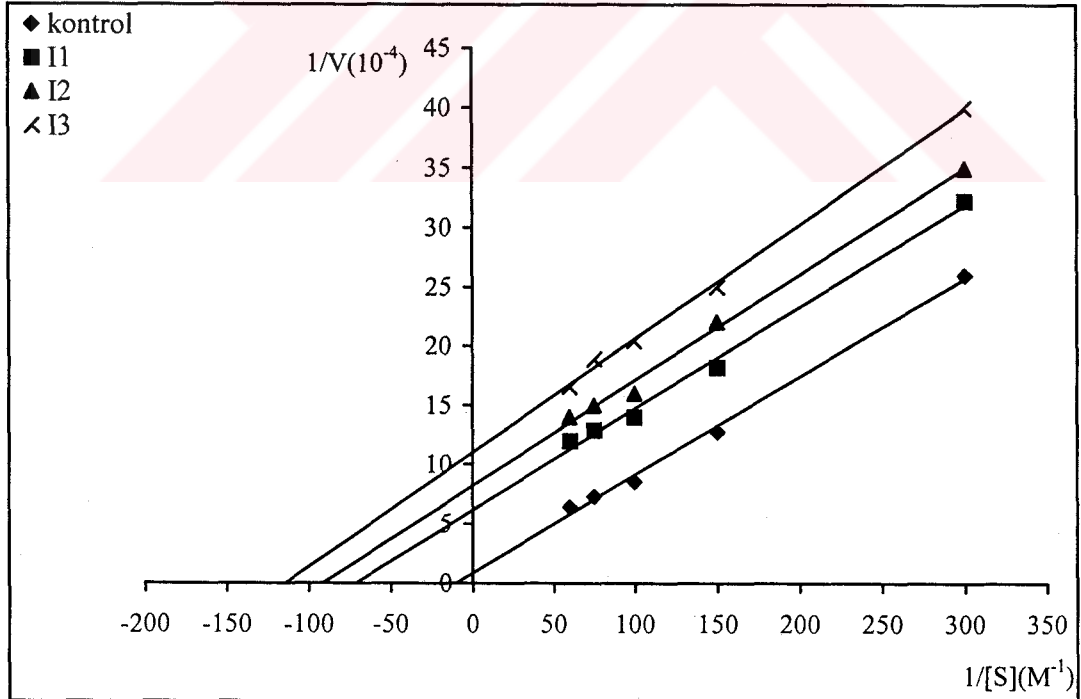
0.1M sitrat/0.2 M Na_2HPO_4 tamponu (μL)	Enzim çözeltisi hacmi (μL)	Substrat çözeltisi hacmi (μL)	Inhibitör çözeltisi hacmi (μL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/\text{V} \times 10^{-4}$	$1/[\text{S}]$
2700	100	-	-	3	3.33	-	0.0770	77	385	25.97	300
2600	200	-	-		6.67	-	0.1570	157	785	12.74	150
2500	300	-	-		10.00	-	0.2350	235	1175	8.51	100
2400	400	-	-		13.33	-	0.2740	274	1370	7.30	75
2300	500	-	-		16.67	-	0.3140	314	1570	6.37	60
2600	100	100	100		3.33	3.33	0.0590	59	295	33.90	300
2500	200	100	100		6.67	3.33	0.1110	111	555	18.02	150
2400	300	100	100		10.00	3.33	0.1590	159	795	12.58	100
2300	400	100	100		13.33	3.33	0.1850	185	925	10.81	75
2200	500	100	100		16.67	3.33	0.2000	200	1000	10.0	60
2575	100	125	125		3.33	4.17	0.0550	55	275	36.36	300
2475	200	125	125		6.67	4.17	0.1030	103	515	19.42	150
2375	300	125	125		10.00	4.17	0.1380	138	690	14.49	100
2275	400	125	125		13.33	4.17	0.1530	153	765	13.07	75
2175	500	125	125		16.67	4.17	0.1710	171	855	11.70	60
2550	100	150	150		3.33	5.00	0.0500	50	250	40.00	300
2450	200	150	150	6.67	5.00	0.0980	98	490	20.41	150	
2350	300	150	150	10.00	5.00	0.1180	118	590	16.95	100	
2250	400	150	150	13.33	5.00	0.1410	141	705	14.18	75	
2150	500	150	150	16.67	5.00	0.1380	138	690	14.49	60	

Çizelge 3.58 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren p-amino benzoik asidin, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.1M sitrat/0.2 M Na_2HPO_4 tamponu (μL)	Enzim çözeltisi hacmi (μL)	Substrat çözeltisi hacmi (μL)	Inhibitör çözeltisi hacmi (μL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2700		100	-	3	3.33	-	0.0770	77	385	25.97	300
2600		200	-		6.67	-	0.1570	157	785	12.74	150
2500		300	-		10.00	-	0.2350	235	1175	8.51	100
2400		400	-		13.33	-	0.2740	274	1370	7.30	75
2300		500	-		16.67	-	0.3140	314	1570	6.37	60
2600		100	100		3.33	1.67	0.0620	62	310	32.26	300
2500		200	100		6.67	1.67	0.1100	110	550	18.18	150
2400		300	100		10.00	1.67	0.1430	143	715	13.99	100
2300		400	100		13.33	1.67	0.1550	155	775	12.90	75
2200	200	500	100		16.67	1.67	0.1670	167	835	11.98	60
2300		100	400		3.33	6.67	0.0570	57	285	35.09	300
2200		200	400		6.67	6.67	0.0910	91	510	21.98	150
2100		300	400		10.00	6.67	0.1250	125	625	1.600	100
2000		400	400		13.33	6.67	0.1330	133	665	15.04	75
1900		500	400		16.67	6.67	0.1430	143	715	13.99	60
1900		100	800	3.33	13.33	0.0500	50	250	40.00	300	
1800		200	800	6.67	13.33	0.0800	80	400	25.00	150	
1700		300	800	10.00	13.33	0.0980	98	490	20.41	100	
1600		400	800	13.33	13.33	0.1060	106	530	18.87	75	
1500		500	800	16.67	13.33	0.1210	121	605	16.53	60	



Şekil 3.94 DPPO enzimi aktivitesi üzerine p-amino metil benzen sülfanamidin inhibisyon etkisi. $[I_1]= 3.33 \times 10^{-3} \text{M}$, $[I_2]= 4.17 \times 10^{-3} \text{M}$, $[I_3]= 5.00 \times 10^{-3} \text{M}$



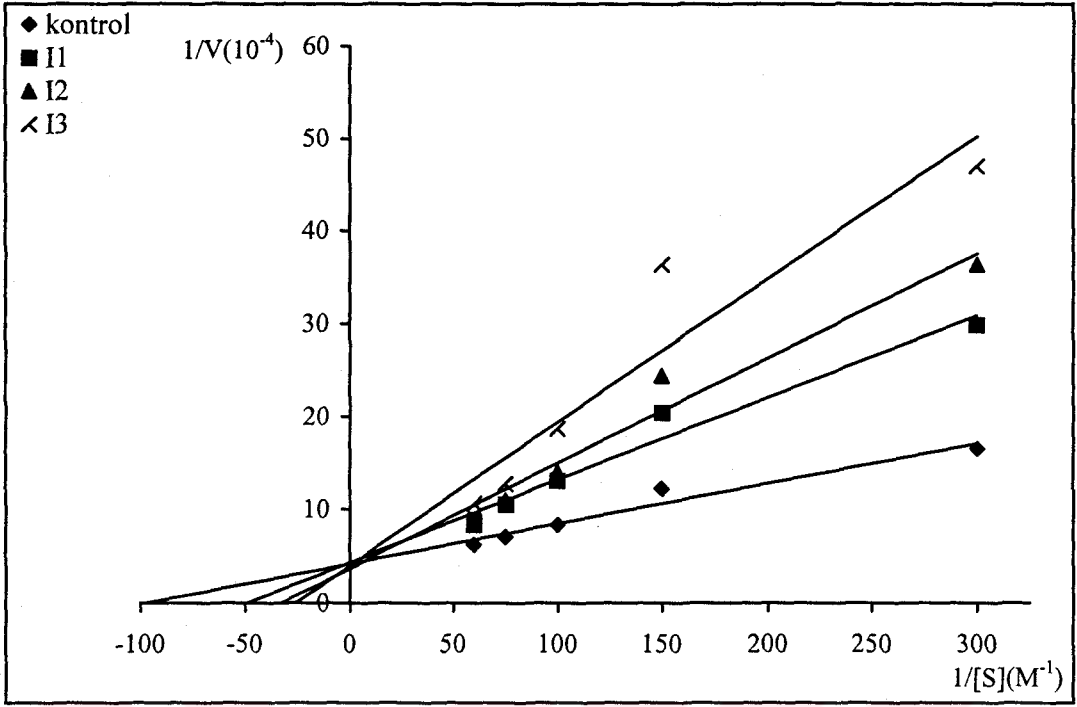
Şekil 3.95 DPPO enzimi aktivitesi üzerine p-aminobenzoik asidin inhibisyon etkisi. $[I_1]= 1.67 \times 10^{-3} \text{M}$, $[I_2]= 6.67 \times 10^{-3} \text{M}$, $[I_3]= 13.33 \times 10^{-3} \text{M}$

Çizelge 3.59 DPPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren L- sistein'in, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

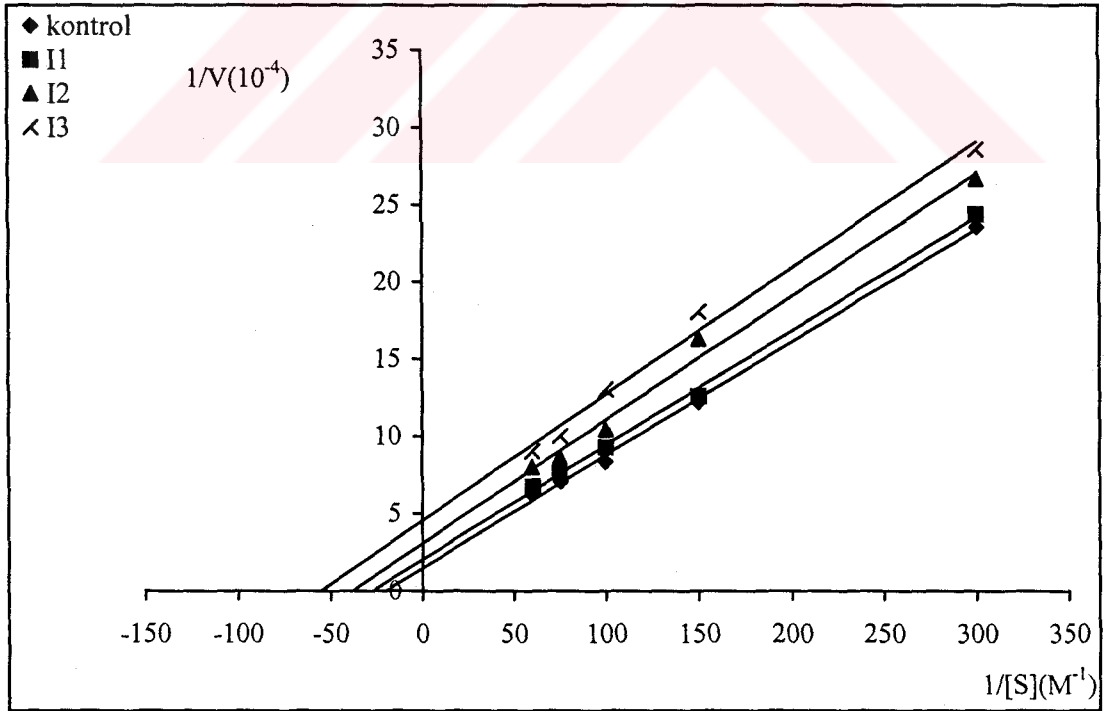
0.1M sitrat/0.2 M Na_2HPO_4 tamponu (μL)	Enzim çözeltisi hacmi (μL)	Substrat çözeltisi hacmi (μL)	Inhibitör çözeltisi hacmi (μL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/\sqrt{x}10^{-4}$	1/[S]
2700		100	-	3	3.33	-	0.0850	85	425	23.53	300
2600		200	-		6.67	-	0.1640	164	820	12.20	150
2500		300	-		10.00	-	0.2400	240	1200	8.33	100
2400		400	-		13.33	-	0.2840	284	1420	7.04	75
2300		500	-		16.67	-	0.3210	321	1605	6.23	60
2650		100	50		3.33	0.0417	0.0670	67	335	29.85	300
2550		200	50		6.67	0.0417	0.0980	98	490	20.41	150
2450		300	50		10.00	0.0417	0.1530	153	765	13.07	100
2350		400	50		13.33	0.0417	0.1900	190	950	10.53	75
2250	200	500	50		16.67	0.0417	0.2390	239	1195	8.37	60
2625		100	75		3.33	0.0625	0.0550	55	275	36.36	300
2525		200	75		6.67	0.0625	0.0820	82	410	24.39	150
2425		300	75		10.00	0.0625	0.1430	143	715	13.99	100
2325		400	75		13.33	0.0625	0.1820	182	910	10.99	75
2225		500	75		16.67	0.0625	0.1980	198	990	10.10	60
2600		100	100		3.33	0.0833	0.0420	42	210	47.62	300
2500		200	100		6.67	0.0833	0.0550	55	275	36.36	150
2400		300	100		10.00	0.0833	0.1070	107	535	18.69	100
2300		400	100		13.33	0.0833	0.1570	157	785	12.74	75
2200		500	100		16.67	0.0833	0.1890	189	945	10.58	60

Çizelge 3.60 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren sulfosalisilik asidin, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.1M sitrat/0.2 M Na_2HPO_4 tamponu (μL)	Enzim çözeltisi hacmi (μL)	Substrat çözeltisi hacmi (μL)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	1/[S]
2700	200	100	-	3	3.33	-	0.0850	85	425	23.53	300
2600	200	200	-		6.67	-	0.1640	164	820	12.20	150
2500	300	300	-		10.00	-	0.2400	240	1200	8.33	100
2400	400	400	-		13.33	-	0.2840	284	1420	7.04	75
2300	500	500	-		16.67	-	0.3210	321	1605	6.23	60
2500	200	100	200		3.33	13.33	0.0820	82	410	24.39	300
2400	200	200	200		6.67	13.33	0.1590	159	795	12.58	150
2300	300	300	200		10.00	13.33	0.2160	216	1080	9.26	100
2200	400	400	200		13.33	13.33	0.2600	260	1300	7.69	75
2100	500	500	200		16.67	13.33	0.2960	296	1480	6.76	60
2300	100	100	400		3.33	26.67	0.0750	75	375	26.67	300
2200	200	200	400		6.67	26.67	0.1230	123	615	16.26	150
2100	300	300	400		10.00	26.67	0.1920	192	960	10.42	100
2000	400	400	400		13.33	26.67	0.2320	232	1160	8.62	75
1900	500	500	400		16.67	26.67	0.2500	250	1250	8.00	60
2100	100	100	600		3.33	40.00	0.0700	70	350	28.57	300
2000	200	200	600	6.67	40.00	0.1110	111	555	18.02	150	
1900	300	300	600	10.00	40.00	0.1540	154	770	12.99	100	
1800	400	400	600	13.33	40.00	0.2000	200	1000	10.00	75	
1700	500	500	600	16.67	40.00	0.2220	222	1110	9.009	60	



Şekil 3.96 DPPPO enzimi aktivitesi üzerine L-sistein'in inhibisyon etkisi. $[I_1]=4.17 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[I_2]=6.25 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[I_3]=8.33 \times 10^{-5} \text{ M}$



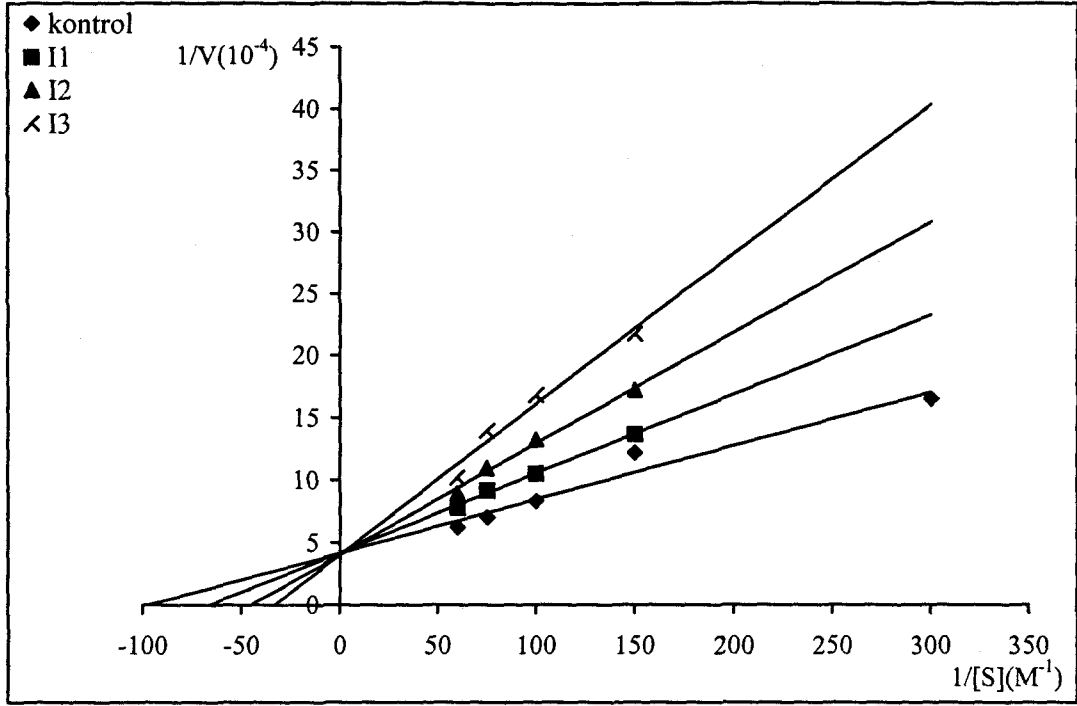
Şekil 3.97 DPPPO enzimi aktivitesi üzerine sulfosalisilik asidin inhibisyon etkisi. $[I_1]=13.33 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[I_2]=26.67 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[I_3]=40.00 \times 10^{-3} \text{ M}$

Çizelge 3.61 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren glutatyon'un, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

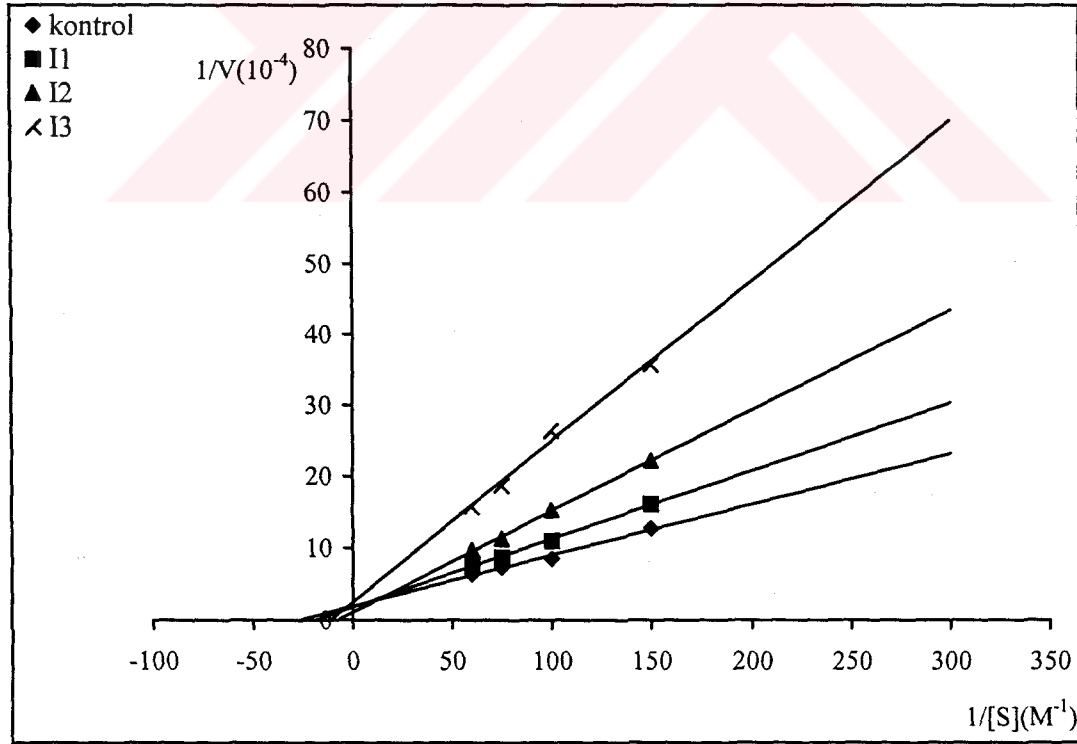
0.1M sitrat/0.2 M Na_2HPO_4 tamponu (μL)	Enzim çözeltisi hacmi (μL)	Substrat çözeltisi hacmi (μL)	Inhibitör çözeltisi hacmi (μL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2700		100	-		3.33	-	0.0850	85	425	23.53	300
2600		200	-		6.67	-	0.1640	164	820	12.20	150
2500		300	-		10.00	-	0.2400	240	1200	8.33	100
2400		400	-		13.33	-	0.2840	284	1420	7.04	75
2300		500	-		16.67	-	0.3210	321	1605	6.23	60
2600		100	100		3.33	0.111	0.0660	66	330	30.30	300
2500		200	100		6.67	0.111	0.1460	146	730	13.70	150
2400		300	100		10.00	0.111	0.1900	190	950	10.53	100
2300		400	100		13.33	0.111	0.2170	217	1085	9.22	75
2200	200	500	100	3	16.67	0.111	0.2560	256	1280	7.81	60
2575		100	125		3.33	0.139	0.0580	58	290	34.48	300
2475		200	125		6.67	0.139	0.1160	116	580	17.24	150
2375		300	125		10.00	0.139	0.1510	151	755	13.25	100
2275		400	125		13.33	0.139	0.1820	182	910	10.99	75
2175		500	125		16.67	0.139	0.2220	222	1110	90.09	60
2550		100	150		3.33	0.167	0.0460	46	230	43.48	300
2450		200	150		6.67	0.167	0.0920	92	460	21.74	150
2350		300	150		10.00	0.167	0.1190	119	595	16.81	100
2250		400	150		13.33	0.167	0.1430	143	715	13.97	75
2150		500	150		16.67	0.167	0.1960	196	980	10.20	60

Çizelge 3.62 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren β -merkapt etanol'ün, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.1M sitrat/0.2 M Na_2HPO_4 tamponu (μL)	Enzim çözeltisi hacmi (μL)	Substrat çözeltisi hacmi (μL)	İnhibitör çözeltisi hacmi (μL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki İnhibitör Kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	$1/[S]$
2700		100	-	3	3.33	-	0.0770	77	385	25.97	300
2600		200	-		6.67	-	0.1570	157	785	12.74	150
2500		300	-		10.00	-	0.2350	235	1175	8.51	100
2400		400	-		13.33	-	0.2740	274	1370	7.30	75
2300		500	-		16.67	-	0.3140	314	1570	6.37	60
2600		100	100		3.33	4.43×10^{-3}	0.0590	59	295	33.90	300
2500		200	100		6.67	4.43×10^{-3}	0.1240	124	620	16.13	150
2400		300	100		10.00	4.43×10^{-3}	0.1820	182	910	10.99	100
2300		400	100		13.33	4.43×10^{-3}	0.2310	231	1155	8.66	75
2200		500	100		16.67	4.43×10^{-3}	0.2580	258	1290	7.75	60
2575	200	100	125		3.33	5.54×10^{-3}	0.0480	48	240	41.67	300
2475		200	125		6.67	5.54×10^{-3}	0.0900	90	450	22.22	150
2375		300	125		10.00	5.54×10^{-3}	0.1310	131	655	15.27	100
2275		400	125		13.33	5.54×10^{-3}	0.1770	177	885	11.30	75
2175		500	125		16.67	5.54×10^{-3}	0.2060	206	1030	9.71	60
2550		100	150		3.33	6.65×10^{-3}	0.0400	40	200	50.00	300
2450		200	150	6.67	6.65×10^{-3}	0.0560	56	280	35.71	150	
2350		300	150	10.00	6.65×10^{-3}	0.0760	76	380	26.32	100	
2250		400	150	13.33	6.65×10^{-3}	0.1070	107	535	18.69	75	
2150		500	150	16.67	6.65×10^{-3}	0.1270	127	635	15.75	60	



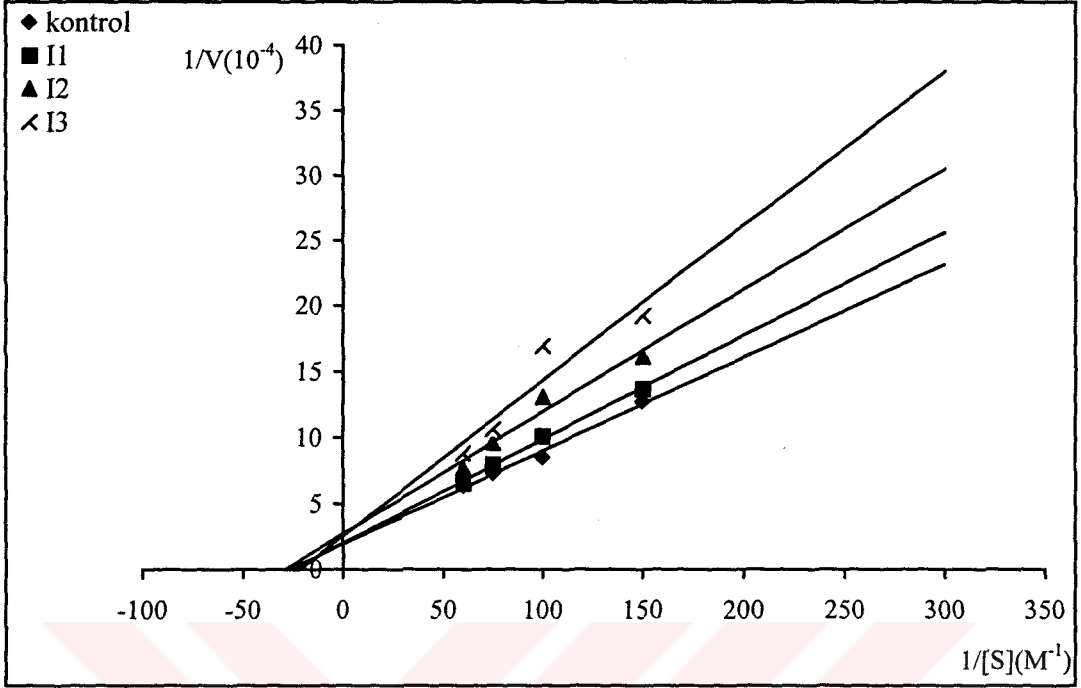
Şekil 3.98 DPPO enzimi aktivitesi üzerine glutatyon'un inhibisyon etkisi. $[I_1]=1.11 \times 10^{-4}$ M, $[I_2]=1.39 \times 10^{-4}$ M, $[I_3]=1.67 \times 10^{-4}$ M



Şekil 3.99 DPPO enzimi aktivitesi üzerine β -merkaptto etanol'ün inhibisyon etkisi. $[I_1]=4.43 \times 10^{-6}$ M, $[I_2]=5.54 \times 10^{-6}$ M, $[I_3]=6.65 \times 10^{-6}$ M

Çizelge 3.63 DPPO enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren 2-merkaptio benzotiazol'ün, katekol substratıyla, K_i değerinin bulunmasında kullanılan çözeltilerin miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ve elde edilen sonuçlar

0.1M sitrat/0.2 M Na_2HPO_4 tamponu (μL)	Enzim çözeltisi hacmi (μL)	Substrat çözeltisi hacmi (μL)	Inhibitör çözeltisi hacmi (μL)	Küvetteki toplam hacim (mL)	Küvetteki Substrat Kons.[S] (mM)	Küvetteki inhibitör Kons.[I] (mM)	ΔOD (420 nm)	U	Aktivite (U/mLdak)	$1/V \times 10^{-4}$	1/[S]
2700	200	100	-	3	3.33	-	0.0770	77	385	25.97	300
2600	200	200	-		6.67	-	0.1570	157	785	12.74	150
2500	200	300	-		10.00	-	0.2350	235	1175	8.51	100
2400	200	400	-		13.33	-	0.2740	274	1370	7.30	75
2300	200	500	-		16.67	-	0.3140	314	1570	6.37	60
2600	200	100	100		3.33	0.0833	0.0680	68	340	29.41	300
2500	200	200	100		6.67	0.0833	0.1460	146	730	13.70	150
2400	200	300	100		10.00	0.0833	0.1980	198	990	10.10	100
2300	200	400	100		13.33	0.0833	0.2520	252	1260	7.94	75
2200	200	500	100		16.67	0.0833	0.3050	305	1525	6.56	60
2575	200	100	125		3.33	0.1042	0.0590	59	295	33.90	300
2475	200	200	125		6.67	0.1042	0.0640	64	320	31.25	150
2375	200	300	125		10.00	0.1042	0.1240	124	620	16.13	100
2275	200	400	125		13.33	0.1042	0.2080	208	1040	9.62	75
2175	200	500	125		16.67	0.1042	0.2600	260	1300	7.69	60
2550	200	100	150		3.33	0.1250	0.0480	48	240	41.67	300
2450	200	200	150	6.67	0.1250	0.1040	104	520	19.23	150	
2350	200	300	150	10.00	0.1250	0.1180	118	590	16.95	100	
2250	200	400	150	13.33	0.1250	0.1880	188	940	10.64	75	
2150	200	500	150	16.67	0.1250	0.2270	227	1135	8.81	60	



Şekil 3.100 DPPO enzimi aktivitesi üzerine 2-merkaptobenzotiazol'ün inhibisyon etkisi. $[I_1] = 8.33 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[I_2] = 10.42 \times 10^{-5} \text{ M}$, $[I_3] = 12.50 \times 10^{-5} \text{ M}$

Çizelge 3.64 DPPO enziminin Lineweaver-Burk grafiklerinden bulunan K_i değerleri.

İnhibitör	I [mM]	K_i [mM]	Ortalama K_i değerleri[mM]	İnhibisyon Türü
β-merkaptotanol	4.43×10^{-3}	4.859×10^{-7}	6.77×10^{-7}	nonkompetatif
	5.54×10^{-3}	10.29×10^{-7}		
	6.65×10^{-3}	5.15×10^{-7}		
Ditiyoeritritol	0.017	1.456×10^{-6}	1.71×10^{-6}	nonkompetatif
	0.021	1.829×10^{-6}		
	0.025	1.844×10^{-6}		
2-merkaptobenzotiazol	0.083	7.99×10^{-6}	8.27×10^{-6}	nonkompetatif
	0.010	7.37×10^{-6}		
	0.013	9.44×10^{-6}		
p-amino benzoik asit	1.67	2.25×10^{-5}	6.29×10^{-5}	unkompetatif
	6.67	6.69×10^{-5}		
	13.33	9.94×10^{-5}		
p-amino metil benzen sülfan amid	3.33	8.73×10^{-5}	7.50×10^{-5}	unkompetatif
	4.17	7.19×10^{-5}		
	5.00	6.59×10^{-5}		
Sodyum azid	3.00	1.505×10^{-4}	2.290×10^{-4}	nonkompetatif
	5.00	2.230×10^{-4}		
	10.00	3.144×10^{-4}		
Sulfosalisilik asit	13.33	9.60×10^{-4}	11.68×10^{-4}	unkompetatif
	26.67	12.62×10^{-4}		
	40.00	12.83×10^{-4}		
L-sistein	0.042	4.24×10^{-2}	0.035	kompetatif
	0.063	3.17×10^{-2}		
	0.083	2.99×10^{-2}		
Glutatyon	0.111	0.235	0.148	kompetatif
	0.139	0.121		
	0.167	0.087		

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, gıda endüstrisinde çoğu zaman istenmeyen enzimatik reaksiyonla kararmaya neden olan PPO enziminin saflaştırılması için yeni bir afinite jeli sentezlenmiştir. Bu afinite jeli kullanılarak dut (*Morus alba* L.) ve yer elmasından (*Helianthus tuberosus* L.) PPO enzimleri saflaştırılarak kinetik ve elektroforetik özellikleri incelenmiştir

Afinite kromatografisinde kullanılan jel, ardışık üç basamak modifikasyon sonucu sentezlendi. Önce matriks olarak seçilen Sepharose-4B, CNBr ile aktifleştirildi ve buna uzantı kolu olarak L-tirozin bağlandıktan sonra, diazolanmış p-amino benzoik asit katıldı. Sepharose-4B'nin matriks olarak seçilmesinin başlıca sebebi çok iyi akış özelliğine sahip olması ve ayrıca serbest -OH grupları taşıdığından, CNBr ile çok kısa bir süre içerisinde aktifleştirilebilmesidir. Bu amaçla literatürde karbodiimid bileşiklerinde kullanıldığı bildirilmektedir [146]. Karbodiimid ile aktifleştirilmiş matrikse primer amin grubunun bağlanması ile amid bağı oluşmaktadır. Bu bağ kromatografi işlemlerinde dayanıklıdır. Fakat, aktifleştirme esnasında jel, pH 4.5'da 24 saat süre ile karıştırılmaktadır. Bu işlem kromatografi sırasında jelin akış özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir [146]. Bir başka aktifleştirme işleminde epoksi bileşiklerinden yararlanılmıştır [147]. Kromatografi işlemlerinde gayet dayanıklı olan bu yapılar, 16 saat aktifleştirme ve 16 saat ligand bağlama süresi olmak üzere toplam 32 saatte gerçekleşmektedir. pH'nın 10 civarında olması, jelin kimyasal yapısını etkilememesine rağmen uzun süre karıştırma işlemleri, polisakkarit partiküllerinin fiziksel yapısının deformasyonuna sebep olabilir. Sonuç olarak, hazırlanacak afinite jelinin akış özellikleri olumsuz yönde etkilenecektir. Çalışmamızda kullanılan CNBr ile aktifleştirme işlemi sadece beş dakikada gerçekleştirilmektedir. Böylece jelin fiziksel yapısındaki deformasyon sakıncaları ortadan kaldırılmış oldu.

Bir çok biyolojik molekülde olduğu gibi PPO'nun aktif bölgesi de üç boyutlu yapısının derinliklerindedir. Bu nedenle uzantı kolu kullanılmadan sentezlenen afinite jellerinde enzimle matriksin sterik etkileşmesi sonucu bağlanma verimi düşmekte bu da kolon kapasitesini olumsuz yönde etkilemektedir [148]. Bu sorunu elimine etmek için değişik moleküller uzantı kolu olarak kullanılmaktadır. Uzantı kolu uzunluğu kritik bir değer olup kısa kaldığında bağlanma verimi düşmekte gereğinden uzun olduğu durumlarda ise hidrofilik ve hidrofobik etkileşmelerle istenmeyen bazı bileşiklerinde adsorpsiyonuna neden olmaktadır. L-tirozin, karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için Arslan [149] tarafından hazırlanan afinite jelinde uzantı kolu olarak kullanılmış ve son derece yüksek bir verim elde edilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda, afinite jelinin sentezinde uzantı kolu olarak L-tirozin tercih edilmiştir [149].

Literatürde, PPO enziminin saflaştırılması için hazırlanan afinite jellerinde ligand olarak tropolen, metimazol, L-mimozin, 2-merkaptobenzimidazol, 2-merkaptobenzotiyazol, p-aminobenzoik asit ve p-aminobenzoik asit türevleri kullanılmıştır [150-151]. Fakat bunların içinde p-aminobenzoik asit PPO enzimini daha fazla tutma kapasitesine sahip olduğundan dolayı daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu nedenle araştırmamızda ligand olarak PPO enziminin inhibitörlerinden biri olan p-aminobenzoik asit kullanılmıştır.

Sepharose-4B'nin CNBr ile aktive edilmesiyle hazırlanan afinite jelinin divinil sülfon (DVS) ile hazırlanan afinite jellerine göre daha yüksek PPO absorpsiyonu sağladığı literatürden anlaşılmaktadır [128]. Bu durum afinite jelleri üzerindeki yük farkıyla açıklanabilir. CNBr ile aktive edilen afinite jelinin absorpsiyon koşullarında (pH 5.0 ve 6.0) pozitif yüke sahip olması PPO'nun jele daha kuvvetli bağlanmasını sağlayacaktır. Bu şekilde yıkama esnasında kolona bağlı PPO enziminin uzaklaşması önlenmiştir.

Afinite jelinin sentezi aşamasındaki her bir türevin IR spektrumları alınarak EK A, EK B, EK C ve EK D'de verilmiştir. Sepharose-4B'nin IR spektrumunda (EK A): 3406, 3284, 3345, 3450 cm^{-1} yayvan pikleri OH⁻ pikleridir. 2922, 2933, 2956, 974 keskin pikleri CH, CH₂ ve CH₃ pikleridir. 1050 cm^{-1} C-O bağıny göstermektedir.

CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'nin IR spektrumunda (EK B): 3300, 3600 cm^{-1} civarındaki OH^- piklerinde çok büyük oranda azalma vardır. Bu yapıya CN'nin bağlandığını göstermektedir. 2924, 2952 cm^{-1} 'deki keskin pikler CH, CH_2 ve CH_3 'ü göstermektedir. 2230 cm^{-1} 'deki küçük keskin pik CN grubunu göstermektedir.

CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye L-tirozin'in bağlanmasıyla elde edilen IR spektrumunda (EK C): 3466, 3500, 3534, 3576 ,3607 cm^{-1} pikleri fenolik OH^- , karboksil grubunun OH^- ve N-H pikleri üst üste girmiş durumdadır. Bunların üst üste çakışmasının en büyük nedeni molekül içi hidrojen bağıdır. 1461 cm^{-1} 'de aromatik C=C bağı göstermektedir.

L-tirozine, p-aminobenzoik asidin bağlanmasıyla elde edilen IR spektrumunda (EK D): 3870 cm^{-1} 'deki pik karboksilik asit OH^- 'dir. Hidrojen bağı nedeni ile kaymıştır. 3600 cm^{-1} 'de fenolik OH^- 'ı görülmektedir. 2900, 3000 cm^{-1} arası keskin pikler alifatik ve aromatik CH sinyalleridir. 1400-1500 cm^{-1} arası pikler aromatik C=C sinyalleridir. 1550-1600 cm^{-1} arası zayıf iki pik N=N çift bağına aittir.

Araştırmamızda enzim kaynağı olarak dut (*Morus alba* L.) ve yer elması (*Helianthus tuberosus* L.) seçilmiştir. Dut büyük oranda yaş olarak tüketilmesinin yanısıra pekmez, reçel, marmelat ve meyve suyu yapımında da endüstriyel öneme sahiptir. Ayrıca yer elması özellikle yaş olarak büyük oranda tüketilmektedir. Yer elmasının toprak altındaki yumruları inulin bakımından zengindir ve endüstriyel değeri vardır. PPO enziminin neden olduğu enzimatik kararın gıda işletmeciliğinde karşılaşılan en önemli problemlerden birisidir. DPPO ve YPPO enzimlerinin kinetik özelliklerinin saptanması, bu meyvelerdeki enzimatik kararmanın önlenmesinde daha etkili metodların geliştirilmesine yardımcı olacağı kanaatindeyiz.

Enzimin kolona adsorpsiyonu iki farklı pH'da gerçekleştirildi. 0.05 M sodyum fosfat tamponları (pH 5.0 ve 6.0) kullanıldı. Kolona adsorbe olan PPO enzimi ancak 1M NaCl içeren 0.05 M sodyum fosfat tamponu (pH 8.0) ile elüe edilmiştir. pH'sı 5.0 olan sodyum fosfat tamponu ile dengelenmiş kolondan YPPO % 81.16 verim, 100.39 saflaştırma derecesi ve DPPO'su ise % 20.14 verim, 51.03

saflaştırma derecesi ile enzimler elde edilmiştir. PH 6.0'da ise YPPO'su için % 36.44 verim, 59.68 saflaştırma derecesi ve DPPO'su ise % 21.24 verim ve 74.20 saflaştırma derecesi ile elde edilmiştir.

Saflaştırılan enzimler için nativ ve SDS-PAGE uygulanarak her bir enzim için tek bir bant gözlenmiştir. Her iki enziminde molekül ağırlığı yaklaşık 65 kDa olarak bulunmuştur. PPO enziminin molekül ağırlığı türden türe değişmektedir. Örneğin çay yaprağı 72 kDa, ayçiçeği tohumu 42 kDa, elma 65 kDa, muz 62 kDa, lahana 39 kDa, çin lahanası 65 kDa, ananas 104 kDa, salatalık 56 kDa, hurma ağacı 51 kDa, yenilebilir dul avrat otu 31 kDa, fasulye 30 kDa, fasulye tohumu 110 kDa ve hint fasulyesi 120 kDa molekül ağırlığına sahip PPO enzimi içermektedir [152-164]. YPPO ve DPPO enzimlerinin molekül ağırlığı çay yaprağı, elma, muz, çin lahanası, salatalık ve hurma ağacı PPO'suna benzer; ayçiçeği tohumu, lahana, ananas, yenilebilir dul avrat otu, fasulye, fasulye tohumu ve hint fasulyesinden oldukça farklı olduğu görülmektedir.

Meyve dokularından PPO ekstraksiyonu için çeşitli tamponlar kullanılmaktadır ve pH değerleri enzim kaynağına bağlı olarak değişmektedir. Fakat pH genelde az bazik bir ortam sağlayacak şekilde ayarlanır. Tamponun pH'sı elde edilen enzimin yapısını etkileyebilir. Araştırmamızda birçok literatürde belirtildiği gibi 0.5 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.30) kullanıldı [164-165].

Enzim ekstraksiyonu sırasında fenol oksidasyonunun ve polimerizasyonun önlenmesinin en etkili yollarından birisi de substratların çözünmeyen bir polimere bağlanarak ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Fenol bağlamada en yaygın olarak kullanılan madde polivinil pirolidon (PVP)'dir. PVP, fenollerin iyonlaşmadığı nötral ya da asidik pH'da çok kuvvetli proton alıcısıdır. Aynı zamanda PVP, PPO'nun kısmi yarışmalı inhibitörüdür. Fakat PVP'nin inhibitör etkisi enzim ekstraktının yıkanması ile elimine edilebilir. Bundan dolayı fenollerin bağlanmasında polietilen glikol (PEG) daha çok tercih edilir [114]. Araştırmamızda da bu amaçla fenolleri bağlayıcı olarak PEG kullanılmıştır. Ayrıca, kinonları indirgeyici reaktif olarak ekstraksiyon tamponuna 10 mM askorbik asit ilave edilmiştir.

Farklı sıcaklıklarda (20, 30, 35, 45, 55, 65 ve 75 °C) enzim aktiviteleri üzerine pH'nın etkisi katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak belirlenmiştir. pH 4-4.5 aralığında 0.1 M sitrat/ 0.2 M Na₂HPO₄, pH 5-7 aralığında 0.2 M fosfat ve pH 7.5-9 aralığında 0.2 M Tris tamponu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.12-3.22 ve 3.58-3.68 ve Çizelge 3.9-3.10 ve 3.39-3.40'de verilmiştir. YPPO enziminin optimum pH'sı katekol, 4-metil katekol, pirogallol substratları için 20, 30 ve 35 °C'de değişmemiştir ve sırasıyla 7.0, 5.0 ve 8.0 olarak bulunmuştur. Fakat sıcaklık artışına paralel olarak optimum pH değerlerinde düşme gözlenmiştir. Optimum pH katekol substratı kullanıldığında 75 °C'de 5.0'a, 4-metil katekol kullanıldığında 4.5 ve pirogallol kullanıldığında 7.0'a düşmüştür.

DPPO enziminde katekol substrat olarak kullanıldığında ise 20 °C'de optimum pH 7.0 olarak gözlenirken sıcaklığın 30 °C'ye yükselmesi ile optimum pH 4.5'a düşmüştür. Sıcaklığın 55 °C' ye kadar yükselmesi pH'yı değiştirmemiştir fakat 65 ve 75 °C'lerde optimum pH 5.0'a yükselmiştir. DPPO enziminde 4-metil katekol substrat olarak kullanıldığında ise 20, 30 ve 35 °C'lerde optimum pH değişmemiş ve 4.5 olarak bulunmuştur. Fakat sıcaklığın yükselmesi ile optimum pH 5.0'a yükselmiş ve 75 °C hariç sabit kalmıştır. DPPO enziminde pirogallol substrat olarak kullanıldığında ise sıcaklık artışına paralel olarak optimum pH değerlerinde düşme gözlenmiştir. 20 °C'de optimum pH 8.0 iken 75 °C'de 5.0 olarak bulunmuştur. Aktivitedeki bu değişimler sıcaklığın artmasıyla enzimin üç boyutlu yapısındaki küçük değişmelere bağlanabilir. Ortamın pH'sının, enzimlerin iyonlaşabilen grupları üzerinde önemli etkisi olduğu için enzim aktivitesindeki rolüde büyüktür. Aktif merkezin konformasyonunu koruyup, işlevini yerine getirebilmesi için bu grupların iyonik formda olması gerekir. pH substrattaki iyonlaşabilen gruplarında etkileyebilir.

Genel olarak her iki kaynaktan saflaştırılan PPO enzimlerinin pH 4.5 ile 8.0 arasında değişen yüksek aktivitelere sahip olduğu görülmektedir (Şekil 3.20-3.22 ve 3.66-3.68). Enzimatik kararmanın önlenmesinde ürünün pH'sının bu aralıkların dışında tutulması PPO enziminin kaynaklanan kararmayı önemli ölçüde engelleyeceğini söyleyebiliriz.

Ekstraksiyon metoduna, substrata, enzimin hücre içindeki yerine ve enzim kaynağına bağlı olarak, PPO aktivitesinin optimum pH'sı, geniş bir aralıkta değişir. Genellikle pH 4.0 ve 7.0 arasındadır [164]. Çeşitli kaynaklardan elde edilen PPO ekstraktlarının pH 4.0'ın altında inaktif olduğu bildirilmektedir. Pirogallol ve klorojenik asit substrat olarak kullanıldığında patates homojenatından elde edilen PPO'nun pH 5.0'da inaktif olduğu bulunmuştur. Olgunlaşmamış Satsuma mandalinasından elde edilen PPO, pH 6.0 altında pirogallolü okside edememiştir. Diğer taraftan, üzümde elde edilen bir PPO ekstraktı pH 3.4'te maksimum aktivitesinin % 50'sinden fazlasını korumuştur. Erikten elde edilen PPO nötral ortamda aktivitesini tamamen kaybederken, normal pH'sı olan 3.8'de maksimum aktivite göstermiştir [30]. Kullanılan tamponun türü ve enzimin saflığı da optimum pH'yı etkiler. Bu bakımdan, bağlı ve çözülmüş enzimlerin optimum pH'ları farklıdır. İzoenzimler farklı optimum pH'lara sahip olabilirler. Aynı meyve veya sebzenin olgunlaşmasının farklı aşamalarında elde edilen enzim ekstraktlarının optimum pH'sı farklıdır. Enzim ekstraktlarının çoğu yalnız bir optimum pH'ya sahiptir. Bazı durumlarda, yetersiz saflaştırmadan dolayı ikinci bir optimum pH'ya da rastlandığı bildirilmektedir. Elde ettiğimiz optimum pH değerleri literatürde belirtilen değerlerle uyum içerisindedir.

YPPO enziminin optimum sıcaklığı katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratlarının optimum pH'larında sırasıyla 20, 20 ve 35 °C olarak bulunmuştur. DPPO enziminin optimum sıcaklığı ise katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratlarının optimum pH'larında sırasıyla 45, 20 ve 20 °C olarak bulunmuştur. Optimum pH ve sıcaklık çalışmalarına göre; YPPO enzimi için en yüksek aktivite katekol substratı kullanılarak 20 °C'de pH 7.0'de elde edilmiştir. DPPO enzimi için yine aynı substratla 45 °C'de ve pH 4.5'de en yüksek aktivite gözlenmiştir.

Çalışılan bütün sıcaklıklarda, pirogallol substrat olarak kullanıldığında, pH 7.5'in üzerinde YPPO ve DPPO enzimlerinin aktivitelerinde artış gözlenmektedir. Bu durum alkali şartlarda pirogallolün otooksidasyonuna bağlanabilir.

Yine çalışılan bütün sıcaklıklarda, katekol ve 4-metil katekol substrat olarak kullanıldığında, genelde pH 7.0'nin üzerinde YPPO ve DPPO enzimlerinin

aktivitelerinde ani bir düşüş gözlenmektedir. Bu durum Lerch tarafından, oksidasyon reaksiyonunun PPO'nun histidin rezidüsü ile ilgili olduğu şeklinde açıklanmaktadır [166]. Lerch'e göre histidin rezidüsü alkali şartlarda oksidasyonu inhibe edebilir fakat nötral pH'da aktive edebilir. Şuda ilginç bir gerçektir ki, PPO'nun bir çok meyvedeki optimum pH'sı 6.0-7.5 arasında değişmektedir. pH 7.5'in üzerinde PPO'nun hızlı bir şekilde aktivite kaybetmesi aşağıdaki olasılıkların birine veya bunların kombinasyonuna bağlanabilir; 1- alkali şartlarda enzimin konformasyonel değişime uğrayabilir, 2- enzim, Maillard reaksiyonu ile o-kinonlarla reaksiyona girebilir, 3- o-kinonlar baz tarafından katalizlenen ikincil reaksiyonlara girebilir.

PPO aktivitesinin optimum sıcaklığı üzerine yapılan çalışmalar optimum pH üzerine yapılan çalışmalara oranla daha azdır. Şeftali PPO'sunun aktivitesi, sıcaklık 3 °C'den 37 °C'ye yükseldikçe artmakta, sıcaklık 45 °C' ye kadar yükseldikçe de azalmaktadır. 3 °C sıcaklıkta maksimum aktivitenin % 50'si görülmektedir. PPO enzimi kayısıda 25 °C'de muzda ise 37 °C'de maksimum aktiviteye ulaşmaktadır [27,111]. İki farklı üzüm türü için optimum sıcaklık sırasıyla 25-30 ve 10-15 °C arasında bulunmuştur [30]. Starking ve Cvs. Jonathan elmalarında substrat olarak klorojenik asit kullanıldığında maksimum PPO aktivitesi sırasıyla 30 ve 25 °C olarak bulunmuştur. Substrat olarak pirogallol kullanıldığında ise, enzim aktivitesi sıcaklıkla artmaktadır. Fakat 35 °C'ye gelinceye kadar maksimum aktiviteye rastlanmamıştır [111]. pH 5.2'de klorojenik substratı üzerine yabani havuç PPO'sunun aktivitesi 22-27 °C arasında artarken sıcaklık 32 °C'ye yükselirken bu artış daha az olarak gözlenmiştir [30]. Patateste, 22 °C'de katekol substratı üzerine maksimum aktiviteye ulaşılırken, pirogallol substratı kullanıldığında ise 15-35 °C arasında aktivitede lineer bir artış gözlenmektedir [74]. Literatürlerden anlaşılacağı gibi YPPO ve DPPO için elde edilen optimum sıcaklık değerleri bu verilerle yaklaşık uyum içerisindedir.

pH'ya bağımlı aktivasyon enerjisinin değişimini incelemek için; YPPO ve DPPO enzimleri için yapılan optimum pH ve sıcaklık çalışmalarından elde edilen aktivite değerlerinin (U/mL dak) logaritması reaksiyon sıcaklıklarının (K) tersine (1/T) karşı grafiği çizildi. Arrhenius denkleminde yararlanılarak grafiklerin eğiminden ($-E_a/2.303R$) aktivasyon enerjileri hesaplandı. Çizelge 3.11 ve 3.41

incelendiğinde bazı pH'lardaki aktivasyon enerjisinin negatif değerde olduğu görülmektedir. Literatürde benzer sonuçlara rastlanmıştır [142,165,167]. Bu durum enzimin sıcaklıkla inaktive olduğu şeklinde açıklanmaktadır. Kimyasal reaksiyonların çoğunun hızı sıcaklıkla artar. Enzim katalizli reaksiyonlarda buna uyarlar. Fakat enzimler kompleks yapıli protein molekülleridir. Katalitik etkinlikleri substrat bağlama ve katalitik merkezlere sahip, son derece düzenli bir yapıya sahip olmalarından kaynaklanır. Bu tersiyer yapı, çok sayıda zayıf kovalent olmayan bağlarla oluşur. Yani enzim çok hassas bir yapı gösterir. Eğer molekül büyük bir enerji absoblarsa tersiyer yapı bozulur ve enzim denatüre olur [42].

PPO enziminin sıcaklığa bağımlı denatürasyon özelliğinin araştırılması amacı ile 40, 50, 60, 70 ve 80 °C'lerde 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakikalardaki bekleme süreleri sonunda aktiviteler bulunmuştur. Elde edilen değerler % aktiviteye dönüştürüldü ve zamana karşı % aktivite grafiğı çizildi. YPPO için elde edilen grafik incelendiğinde (Şekil 3.29) 60 dakika inkübasyon sonucunda aktivitede 40 °C'de % 31.8 , 50 °C'de % 65.15, 60 °C'de % 89.22 azalma görülürken, 70 ve 80 °C'lerde enzimin tamamen denatüre olduğu tespit edilmiştir. 70 °C'de 30 dakika ısıtma süresi sonunda enzim aktivitesinde % 93.19 ve 80 °C'de 20 dakika ısıtma süresi sonunda % 98.01 azalma görülmüştür.

DPPO için elde edilen grafik incelendiğinde (Şekil 3.75) ise 60 dakika ısıtma süresi sonunda aktivite de 40 °C'de % 47.39, 50 °C'de % 64.38 ve 60 °C'de % 98.04 azalma görülürken, 70 ve 80 °C'lerde enzimin tamamen denatüre olduğu tespit edilmiştir. 70 °C'de 50 dakika ısıtma süresi sonunda aktivitede % 96.67 ve 80 °C'de 20 dakika ısıtma süresi sonunda % 99.67 azalma görülmüştür. Bu sonuçlardan YPPO enziminin DPPO'suna oranla ısıya daha dayanıklı olduğu görülmektedir.

PPO enziminin sıcaklığa bağımlı renatürasyon özelliğinin araştırılması amacı ile denatürasyon çalışmasında kullanılan ve ilgili sıcaklıklarda bekletildikten sonraki enzim çözeltisi 22 °C'ye kadar soğutuldu. 22 °C'de enzim aktiviteleri YPPO için 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve DPPO için ise 5, 10, 15, 20, 25, 30 dakika zaman aralıklarında 10 mM katekol substratı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen değerler % aktiviteye dönüştürüldü. 22 °C'deki inkübasyon süresine karşılık % aktivite grafiğı

elde edildi (Şekil 3.30 ve 3.76). YPPO enzimi için elde edilen grafik incelendiğinde enzimin hemen hemen renatüre olduğu görülmektedir. Fakat DPPO enzimi için elde edilen grafik incelendiğinde 70 ve 80 °C'lerde bekletilen enzimin renatüre olmadığı, 60 °C'de bekletilen enzimin ise çok az bir düzeyde; 40 ve 50 °C'lerde bekletilen enzimin ise sırasıyla ancak % 53.27 ve % 22.55 orijinal aktivitelerini kazandığı görülmektedir. Bu sonuçlara göre özellikle yer elmasındaki enzimatik kararmanın önlenmesinde termal denatürasyonun uygun bir metot olmadığı görülmektedir. Ancak endüstriyel öneme sahip dut meyvasının işlenmesi sırasındaki enzimatik kararmanın termal denatürasyon ile belirli ölçüde engellenebilir.

Substrat spesifikliğı, optimum pH ve sıcaklıkta olduğu gibi PPO'nun ısı stabilitesi de büyük oranda enzim kaynağına bağlıdır. Genelde, PPO yüksek derecede ısıya dayanıklı enzimlerden değildir [23]. Çözelti veya dokularındaki enzimin, kısa bir süre için, 70-90 °C arasındaki sıcaklıklara maruz bırakılması enzimin katalitik fonksiyonunun kısmen veya tamamen dönüşümsüz olarak kaybına sebep olur. Enzimatik kararmayı düşük sıcaklıklara maruz bırakarak engellemeden önce, meyve ve sebze dokularındaki PPO enzimi genellikle ısı ya da kimyasallarla inaktive edilir.

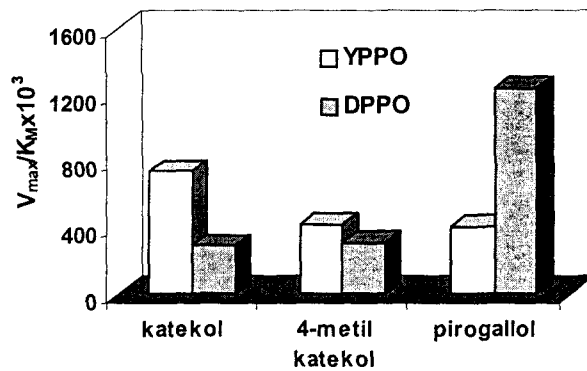
Araştırılan bir çok ayva türünde, PPO'nun inaktivasyonu 95 °C'de 16-30 saniye ve 75 °C'de 25-80 dakika arasında bulunurken bir ayva türünde 75 °C'de 3 dakika sonunda aktivite tamamen kaybolmuştur. Muz PPO'su 42-80 °C arasında ısı inaktivasyonuna maruz kalmaktadır. Enzim pH 6.0'da 42 °C'nin altında oldukça kararlıdır, 42 °C sıcaklıkta bir saatlik ısı muamelesi ise % 8 inaktivasyona sebep olur. Muz PPO'su 80 °C'de 15 dakika süre sonunda tamamen inaktive olmaktadır. Satsuma mandalinaları olağan dışı ısıya dayanıklı PPO'ya sahiptirler. Enzim 80 °C'de 30 dakika sonra bile orijinal aktivitesinin % 50'sinden fazlasını korumaktadır [30]. Isı inaktivasyonu çalışmalarında YPPO ve DPPO enzimleri için elde ettiğimiz sonuçlar, literatürde ayva ve muz PPO'ları için belirtilen değerlere uygunluk göstermektedir.

Her iki kaynaktan saflaştırılan enzimlerin çeşitli substratları için elde edilen aktiviteler Çizelge 3.17 ve 3.47'de gösterilmektedir. YPPO ve DPPO enzimlerinin

kinetik sabitleri (K_M ve V_{max}) optimum pH ve sıcaklıkta katekol, 4-metil katekol, pirogallol, p-kresol ve L-tirozin substratları kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla beş farklı substrat konsantrasyonunda enzim aktiviteleri belirlendi. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak her bir substrat için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. (Şekil 3.31-3.33 ve 3.77-3.79). K_M ve V_{max} değerleri grafiklerin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

Her iki kaynaktan elde edilen PPO enzimi katekol, 4-metil katekol ve pirogallole karşı aktivite gösterirken, monofenollere karşı (p-kresol ve L-tirozin) hiçbir aktivite göstermemiştir. Bu durum YPPO ve DPPO enzimlerinin hidroksilasyon (kresolaz) aktivitesine sahip olmadığını göstermektedir. Benzer sonuçlar bazı araştırmacılar tarafından da bulunmuştur [165,168-170]. Örneğin Beena ve Lalitha, hint fasulyesinden elde ettikleri PPO enziminin katekol, 4-metil katekol, dopa ve pirogallole karşı aktivite gösterdiğini fakat p-kresol ve tirozine karşı hiçbir aktivite göstermediğini tespit etmişlerdir [164]. Ancak bazı kaynaklardan elde edilen PPO enzimlerinin her iki aktiviteyede sahip olduğu literatürden anlaşılmaktadır [42,158,172].

YPPO enziminin katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları için bulunan V_{max} / K_M değerlerinden, bu enzim için katekolün en iyi substrat olduğu bunu da 4-metil katekol ve pirogallolün takip ettiği anlaşılmaktadır (Şekil 4.1). Ancak bu sıralamanın farklı türlerden elde edilen PPO enzimleri için değiştiği literatürde görülmektedir [152-156].



Şekil 4.1 YPPO ve DPPO'nun üç farklı substratına karşı V_{max}/K_M değerlerinin değişimini gösteren grafik.

DPPO enziminin katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları için bulunan V_{max}/K_M değerlerine göre; pirogallolün DPPO için en iyi substrat olduğu bunu da 4-metil katekol ve katekolün takip ettiği görülmektedir (Şekil 4.1).

Katekol ve 4-metil katekol substratları, DPPO enzimi tarafından oksidasyona uğrarlar fakat 4-metil katekolün oksidasyonu daha hızlı bir şekilde gerçekleşir(daha yüksek V_{max}/K_M değerine sahiptir). Bu durum, 4-metil katekol substratının para pozisyonunda bulunan elektron verici metil grubunun katalitik verimi büyük oranda arttırdığı şeklinde açıklanmaktadır [164].

Farklı kaynaklardan elde edilen PPO enzimlerinin katekol substratı için 0.011 mM'dan 84.2 mM'a kadar değişen K_M değerleri bildirilmektedir. [157-158,160,162-164,167-168,172-173]. Amasya elması, hurma ağacı, fasulye, fasulye tohumu ve hint fasulyesinden izole edilen PPO enzimlerinin 4-metil katekol substratı için elde edilen K_M değerleri 1.6- 4.0 mM arasında değişmektedir [160,162-164,167]. Pirogallolün substrat olarak kullanılmasıyla çin lahanası, amasya elması, yali armutu, fasulye tohumu ve hint fasulyesinden elde edilen PPO enzimleri için 2.6 - 27 mM arasında değişen K_M değerleri bildirilmektedir [157,163-164,167-168].

Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen PPO enzimlerinin farklı substratları için farklı V_{max} değerleri bildirilmektedir. Çin lahanası, malatya kayısı, hurma ağacı, yali armudu ve fasulyeden izole edilen PPO enzimleri için katekol substratıyla bulunan V_{max} değerleri sırasıyla 67.6, 833, 91, 766 ve 3846 U/mL'dir; hurma ağacı ve fasulye PPO'su için 4-metil katekol substratıyla bulunan V_{max} değerleri sırasıyla 750 ve 2577 U/mL'dir; çin lahanası ve yali armutu PPO'su için pirogallol substratı ile bulunan V_{max} değerleri 14.1 ve 423 U/mL'dir olarak verilmiştir [157,160,162,168,172].

YPPO enzimi için katekol substratı kullanılarak bulunan K_M değeri malatya kayısı, yali armutu, fasulye tohumu için elde edilen değerlere; 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak bulunan K_M değerleri ise sırasıyla amasya elması ve fasulye tohumunda elde edilen değerlere çok yakın bulunmuştur. YPPO enzimi için katekol ve 4-metil katekol substratları kullanılarak bulunan V_{max} değerleri

fasulye PPO'su için aynı substratlarla elde edilen değerlere oldukça yakındır. 4-metil katekol substratı kullanılarak DPPO enzimi için bulunan V_{max} değeri fasulye PPO'su için bildirilen değere benzerlik göstermektedir.

Gıda endüstrisinde enzimatik kararım PPO'nun termal inaktivasyonu ile önlenir. Ancak yer elmasında olduğu gibi enzimin renatüre olması bu yöntemin uygulanmasını sınırlamaktadır. Ayrıca ısı uygulamasının gıda ürünündeki doku yumuşamasına ve tat kaybına sebep olması bir diğer sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Enzimatik kararımın önlenmesinde en etkili yöntem PPO'nun inhibitörlerinin kullanılmasıdır. Bu amaçla bisülfid, askorbik asit ve türevleri, metal şelatlayıcıları, glutasyon, sülfatlı polisakkaritler, poli fosfatlar, rezorsinol türevleri, tropolen ve siklo dekstrinler PPO inhibitörü olarak çalışılmıştır [2].

Araştırmamızda her iki kaynaktan elde edilen PPO enzimi üzerine β -merkapt etanol, 2-merkapt benzotiazol, glutasyon, L-sistein, ditiyoeritritol, 2,4-dikloro-5-sülfamoil benzoik asit, p-aminobenzoik, benzoik asit, 4-karboksi benzen sülfanamid, sulfosalisilik asit, sülfanamid, sodyum azid ve NaEDTA inhibitörlerinin etkisi incelenmiştir. İnhibisyon etkisi, K_i ve I_{50} olmak üzere iki farklı değerle verilebilir. En uygun parametre K_i sabitleridir. Çünkü materyal ve yöntemlerde belirtildiği gibi K_i sabitinin belirlenmesi için en az üç sabit inhibitör konsantrasyonunda çalışmalar yapılmakta ve her bir sabit inhibitör konsantrasyonunda beş farklı substrat konsantrasyonu için hız değerleri belirlenmektedir. Bunun sonucu olarak çok hassas sonuçlar elde edilmektedir. Ayrıca bu yöntemle inhibisyon mekanizması saptanmaktadır. Fakat bazı araştırmacıların inhibisyon etkisini tespit etmek için I_{50} değerlerini de kullandıkları bilinmektedir. Bu amaçla substrat konsantrasyonları sabit tutularak, değişik inhibitör konsantrasyonlarında, yüzde aktiviteler belirlenmekte ve daha sonra grafik yolu ile % 50 inhibisyona sebep olan inhibitör konsantrasyonu hesaplanmaktadır. Bu yöntem, K_i sabitinin tespit edilmesine göre daha az hassas olmasına rağmen, uygulaması daha kolay olduğu için pratikte kullanılmaktadır. Yukarıdaki sebepler göz önüne alınarak, hem K_i değerleri, hem de beş farklı inhibitör konsantrasyonu için sabit substrat konsantrasyonunda I_{50} değerleri her iki kaynaktan saflaştırılan PPO enzimleri için tespit edilmiştir.

Farklı inhibitörlerin I_{50} değerlerini bulmak için optimum şartlarda katekol substratını 10mM sabit konsantrasyonda çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.34-3.47 ve 3.80-3.91 ve Çizelge 3.18-3.25 ve 3.48-3.54'de verildi.

YPPO ve DPPO enzimleri için β -merkaptto etanolün en güçlü inhibitör olduğu görülmektedir (Çizelge 3.25-3.54). Aynı inhibitörün çin lahanası, malatya kayısı ve fasulye tohumundan izole edilen PPO enzimleri üzerinde de güçlü inhibitör etkisi gösterdiği bildirilmektedir [157,163,172].

YPPO enzimi için en zayıf inhibitör NaEDTA olurken, DPPO enzimi için ise etilen glikolün olduğu bulunmuştur. PPO'nun sebep olduğu enzimatik kararım reaksiyonunun önlenmesi için kullanılan bileşikler arasında yer alan 2-merkaptto benzotiazol ve β -merkaptto etanol inhibitörlerinin toksit etkilerinden dolayı gıda endüstrisinde kullanımı sakıncalı olduğundan, ısı ile inaktivasyon da dokuda yumuşamaya ve tat kaybına yol açtığından fazla tercih edilmemektedir. Fakat toksit etkisi olmayan glutatyon ve bir amino asit olan L-sistein'in inhibitör olarak kullanılması enzimatik kararımın engellenmesinde alternatif bir yöntem olarak düşünülebilir. L-sistein, o-kinonlarla kararlı bileşik oluşturmasının yanında sulfhidril grupları veya enzimin diğer amino asit rezidüleri ile reaksiyona girerek inhibisyon etkisi göstermektedir. Ditiyoeritritol ise, PPO'nun aktif bölgesindeki bakırı şelatlayarak inhibisyon etkisi gösterir [164].

Farklı inhibitörlerin K_i değerlerinin bulunması amacıyla önce inhibitörsüz ortamda optimum şartlarda beş farklı katekol substratı konsantrasyonlarında aktiviteler ölçüldü. Daha sonra üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu için beş farklı substrat konsantrasyonunda aktivite tayinleri yapıldı. $1/V$ ve $1/[S]$ değerlerinden Lineweaver Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden yararlanılarak K_i değerleri ve inhibisyon türleri tespit edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.48-3.51 ve 3.89-3.97, Çizelge 3.26-3.30 ve 3.55-3.64'de verildi.

YPPO enzimi için ditiyoeritritol, L-sistein, sodyum azid ve sülfosalisilik asit inhibitörlerinin K_i değerleri sırasıyla 8.82×10^{-6} , 2.19, 9.58, 10.40 mM olarak tespit edilmiştir. L-sistein, sodyum azid ve sülfosalisilik asit inhibitörlerinin YPPO enzimi

üzerindeki inhibisyon türü kompetatif, ditiyoeritritol için ise unkompetatif olduğu bulunmuştur.

DPPO enzimi için β -merkapt etanol, ditiyoeritritol, 2-merkapt benzotiyazol, p-aminobenzoik asit, p-amino metil benzen sülfanamid, sodyum azid, sulfosalisilik asit, L-sistein ve glutasyon inhibitörleri için K_i değerleri Çizelge 3.64'de verilmiştir. β -merkapt etanol, ditiyoeritritol, 2-merkapt benzotiazol ve sodyum azid inhibitörlerinin DPPO enzimi üzerindeki inhibisyon türü nonkompetatif, p-aminobenzoik asit, p-amino metilbenzen sülfanamid ve sulfosalisilik inhibitörleri unkompetatif, L-sistein ve glutasyon inhibitörleri için ise kompetatif olduğu bulunmuştur.

β -merkapt etanol, ditiyoeritritol, sülfosalisilik asit ve L-sistein inhibitörlerinin fasulye tohumundan izole edilen PPO enzimi üzerindeki inhibisyon türü kompetatif, sodyum azid için ise unkompetatif olduğu bildirilmektedir [163]. Kuş burnu meyvesinden izole edilen PPO enzimi üzerine benzoik asit ve β -merkapt etanol inhibitörlerinin nonkompetatif inhibisyona, L-sistein, glutasyon, sodyum azid ve ditiyoeritritolün ise kompetatif inhibisyona sebep olduğu bildirilmektedir [42].

Enzim kaynağına ve kullanılan inhibitörlere göre inhibisyon türünde çoğu zaman değişmektedir. Bir çok yayında NaEDTA ve etilen glikolün zayıf inhibisyona sebep oldukları belirtilmektedir [42,163,168]. Çalışmamızda aynı sonuç YPPO ve DPPO enzimleri içinde tespit edilmiştir.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

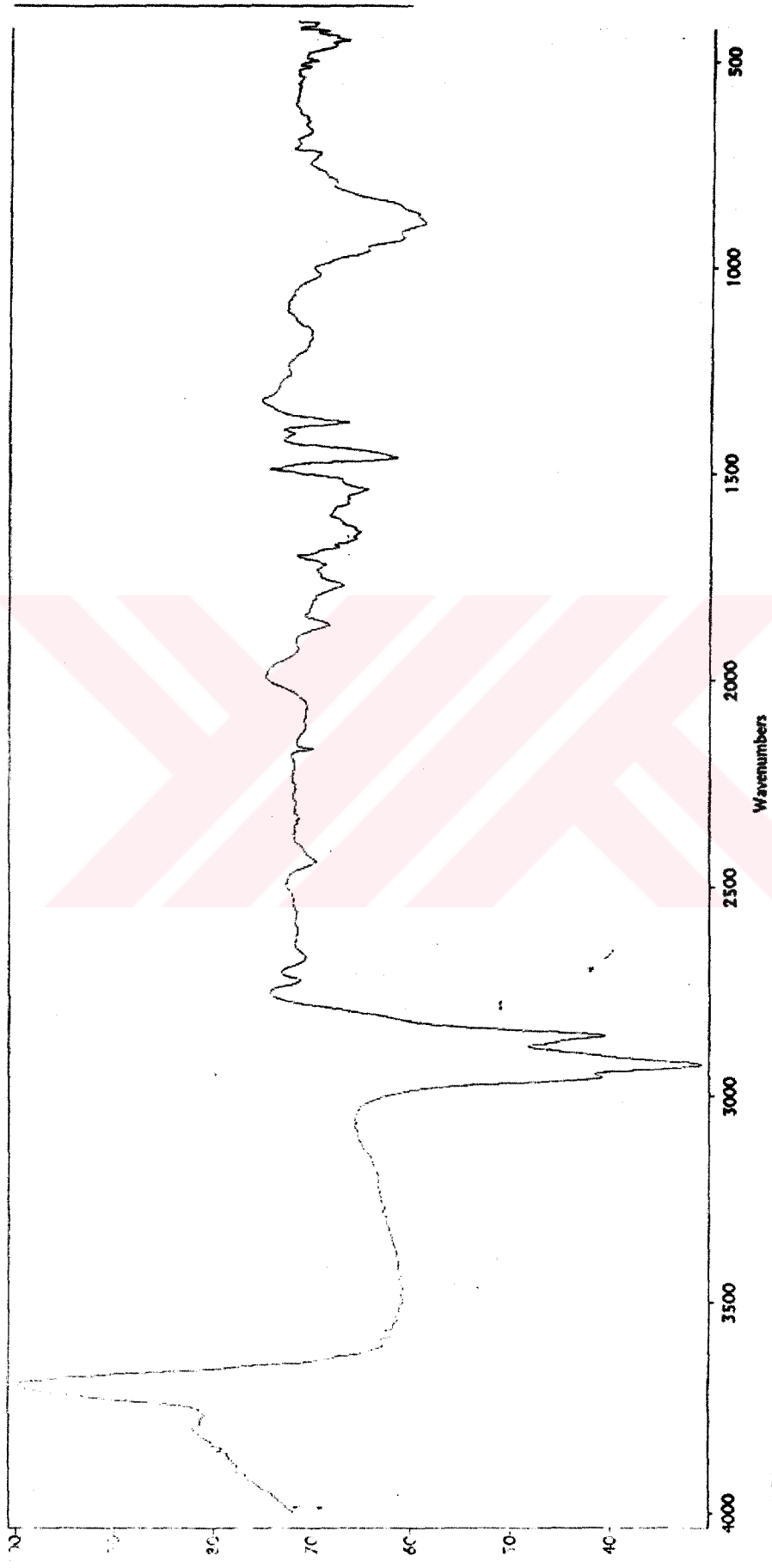
- PPO enziminin saflaştırılması için *Sepharose 4B- L- tirozin- p-aminobenzoik asit* kimyasal yapısına sahip yeni bir afinite jeli sentezlenmiştir.
- Bu afinite jeli kullanılarak dut ve yer elmasından PPO enzimi saflaştırılmıştır.

- Afinite kromatografisi ile saflaştırılan yer elması ve dut PPO enzimleri nativ ve SDS-PAGE elektroforezinde tek bant elde edilmiş ve her iki enziminde molekül ağırlıkları yaklaşık olarak 65 kDa olarak bulunmuştur.
- Saflaştırılan enzimlerin optimum pH ve sıcaklıkları katekol, 4-metil katekol ve pirogallol substratları kullanılarak bulunmuştur.
- Optimum şartlarda yapılan kinetik çalışmalar sonucu yer elması PPO enziminin en çok katekol substratına karşı, dut PPO enziminin ise pirogallol substratı üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Yer elması ve dut PPO enzimlerinin monofenollere (p-kresol ve L-tirozin) karşı hiçbir aktivite göstermediği bulunmuştur.
- Genel olarak her iki kaynaktan saflaştırılan PPO enzimleri pH 4.5 ile 8 arasında değişen yüksek aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir. Enzimatik kararmanın önlenmesinde ürünün pH'sının bu aralıkların dışında tutulması PPO enziminden kaynaklanan kararmayı önemli ölçüde engelleyeceği söylenebilir.
- Endüstriyel öneme sahip dut meyvesinin işlenmesinde enzimatik kararmanın termal denatürasyon ile belirli ölçüde engellenebileceği fakat yer elmasındaki enzimatik kararmanın önlenmesinde termal denatürasyonun uygun bir metot olmadığı kanısına varılmıştır.
- Saflaştırılan her iki enzim üzerinde en kuvvetli inhibitörlerin β -merkaptoetanol ve 2-merkaptobenzotiyazol, en zayıf inhibitörlerin ise NaEDTA ve etilen glikol olduğu bulunmuştur.
- Karbonik anhidraz enziminin spesifik inhibitörleri olan ve bir kısmı klinikte ilaç olarak kullanılan sülfanamid bileşiklerinin PPO enzimleri üzerinde inhibisyon etkisi tarafımızdan ilk defa incelenmiştir. Bu bileşiklerin yer elması ve dut PPO enzimlerini belirli ölçülerde inhibe ettiği bulunmuştur.

5. EKLER

Afinite jelinin sentezi aşamasındaki her bir türevin IR spektrumları çekildi ve spektrumlar EK A, EK B, EK C ve EK D'de sunulmuştur.



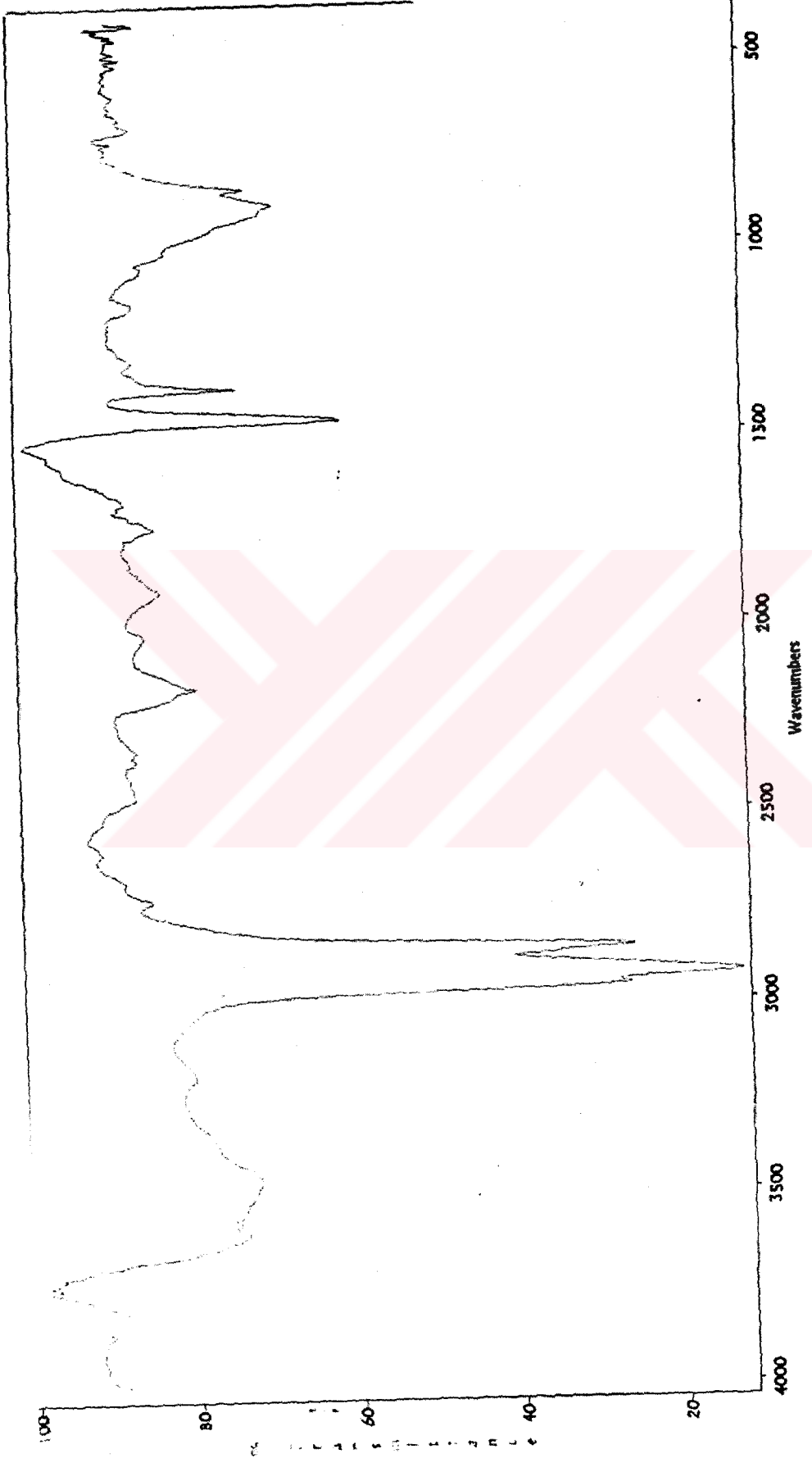


01: sepha-4-B1

EK A. Sepharose-4B'nin IR spektrumu

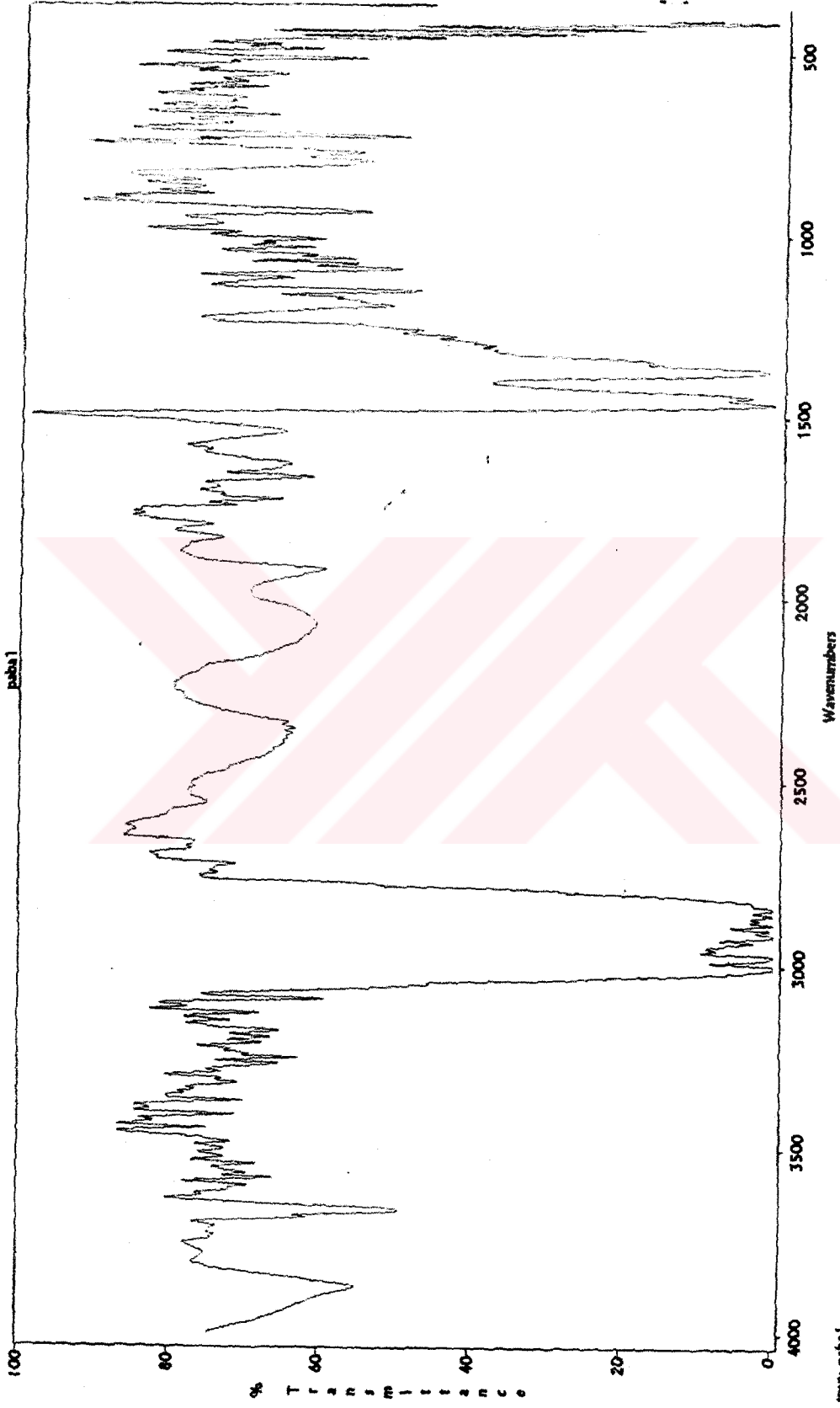


EK B. CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'nin IR spektrumu



L-TIROZİN: L-tyrosin

EK C. CNBr ile aktive edilmiş Sepharose-4B'ye uzantı kolu olarak L-tirozinin bağlanması ile oluşan yapının IR spektrumu



f: tmp: puba1

EK D. L-tirozine p-amino benzoik asidin bağlanması ile sentezlenen afinite jelinin IR spektrumu. 205

6. KAYNAKLAR

- [1] Pekyardımcı, Ş., “Polifenol oksidaz enzimi ve esmerleşme reaksiyonlarının gıda endüstrisinde uygulamaları”, *Gıda*, 17(3), (1992), 181.
- [2] Laurila, E., Kervinen R., and Ahvenainen, R., “The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits”, *Postharvest News and Information*, 9(4), (1998), 53.
- [3] Yang, Chang-Peng., Fujita, S., Kohno, K., Kusubayashi, A., Ashrafuzzaman, M. D., and Hayashi, N., “Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Peel”, *J. Agric. Food Chem.*,49, (2001), 1446.
- [4] Valero,E., and Garcia-Carmona, F., “pH-Dependent Effect of Sodium Chloride on Latent Grape Polyphenol Oxidase”, *J.Agric.Food Chem.*, 46, (1998), 2447.
- [5] Rocha, A., Cano, M. P., Galeazzi, M. A. M., and Morais, A. M M B. “Characterization of ‘Starking’ Apple Polyphenoloxidase”, *J. Sci. Food Agric.*,77, (1998), 527.
- [6] Chang, S., Tan. C., Frankel,E.N., and Barrett, D.M., “Low-Density Lipoprotein Antioxidant Activity of Phenolic Compounds and Polyphenol Oxidase Activity in Selected Clingstone Peach Cultivars”, *J.Agric. Food Chem.*, 48, (2000), 147.
- [7] Manzocco, L., Nicoli, M. C., Anese, M., Pitotti, A., & Maltini,E., “Polyphenoloxidase and peroxidase activity in partially frozen systems with different physical properties”, *Food Research International*. 31, (1999), 363.
- [8] Lee, C.Y., Kagan, V., Jaworski, A.W., and Brown, S.K., “Enzymatic browning in relation to phenolic compounds and polyphenoloxidase activity among various peach cultivars”, *J.Agric. Food Chem.*, 38, (1990), 99.
- [9] Mathewson, P.R., *Enzymes*, Eagen Press Handbook Series,(2000), 37.
- [10] Mcweeny, D.J., “The chemistry of non-enzymatic browning in foods and its control by sulphites”, *J. Sci. Food Agric.* 25, (1974), 735.

- [11] O'brein, J., Morrissey, P. A., "Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in food", *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 3 (1989), 211.
- [12] White, J.S., and White, D.C., *Source Book of Enzymes*, CRC Press LLC, Florida, (1997), 33431.
- [13] Whitaker. J. R., *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Marcel Dekker. New York, (1972), Chapters 22 and 24.
- [14] Sarkar, J. M., Leonowicz, A., Bollog. J. M., " Immobilization of enzymes on clays and soils", *Soil Biol. Biochem*, 21 (2), (1989), 223.
- [15] Gul'ko, A. Y. and Khaziyev, F. K., "Soil polyphenol oxidases; their production, immobilization and activity", *Eurasian Soil Science*, 25 (4), (1993), 101.
- [16] Mos'ko, A. A., Shcherbakova, T. A., Glushko, and N. A., Klenitskaya, I. A., "Immobilization of polyphenol oxidase by soil humus", *Eurasian Science*, 5, (1992), 60.
- [17] Ragazzi, E. and Veronese, G., "Ricerche sulle fenolossidasi esul contenuto in o-difenolli delle olive", *Ann. Chim.*, 57, (1967), 1476.
- [18] Tolbert, N. E., "Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts", *Plant Phatol.*, 51, (1973), 234.
- [19] Craft, C. C., "Localization and activity of phenolase in the potato tuber", *Ant. Potato J.*, 43, (1966), 112.
- [20] Stephens, G. J. And Wood, R. K. S., "Release of enzymes from cell walls by an endopectate-trans-elminase", *Nature*, 251, (1974), 358.
- [21] Parish, R. W., "The intracellular location of phenol oxidases and peroxidase in stems of spinach beet (*Beta vulgaris* L.)", *Z. Pflanzenphysiol.*, 66, (1972), 176.
- [22] Harel, E., Mayer. A. M., and Shain. Y., "Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition"., *Physiol Plant.*, 17, (1964), 921.

- [23] Mayer, A. M., "Polyphenol oxidases in plants-Recent progress", *Phytochemistry*, 26, (1987), 11.
- [24] Dang, F., "Localization and solubility of polyphenoloxidase in stone fruits", *Nauchni Tr. Vissh. Inst. Khranit Vkuvosa Promst.*, 18, (1971), 241.
- [25] Voight, J., and Noske, R., "Zur Bestimmung der Polyphenoloxidase aktivitat. H. Orientierende Versuche zur Anwendbarkeit der Methode mit Besthorns Reagens in Apfeln", *Z. Lebensm Unters. Forsch.*, 130, (1986), 9.
- [26] Hiescu-Moruju, E., "Activity of oxidases in sweet cherries during growth and maturation", *Stud. Cer. Biochem.*, 12, (1969), 47.
- [27] Palmer, J. K., "Banana polyphenoloxidase. Preparation and properties", *Plants Phys.*, 38, (1963), 508.
- [28] Padron, M. P., Lorano, J. A., and Gonsales, A. G., "Properties of o-diphenol oxidoreductase from *Musa cavendsha*", *Phytochemistry*, 14, (1975), 1959.
- [29] Yankon, S. J., "Activite et localisation du ferment polyphenoloxidase dans certains fruits", *C. R., Acad Bul. Soct.*, 14, (1961), 455.
- [30] Vamos-Vigyazo, L., "Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables", *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 14, (1981), 44.
- [31] Brooks, D. W. and Dawson, Ch. R., Aspects of tyrosinase chemistry, in *The Biochemistry of Copper*. Peicash, J., Aisen, P., and Blumberg, W. E. Eds., Academic Press, New York, (1966), 343.
- [32] Pendharkar, M. B. and Nair, P. M., "Alterations in *Solanum tuberosum* polyphenol oxidase activity induced by gamma irradiation", *Phytochemistry*, 13, (1964), 1373.
- [33] Matheis, G. and Belitz, H. D. "Studies on enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). Kinetics of potato phenoloxidase (E. C. 1,14,18,1 monophenol, dihydroxyphenylalanine:oxygen-oxidoreductase)", *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 163, (1977), 191.
- [34] Schill, L., and Grisebach, H., *Z. Physiol. Chem.*, 354, 1555, 1973, as cited in Zaprometov, M. N., "Metabolism of phenolic compounds in plants", *Biokhimiya.*, 42, (1977), 3.

- [35] Bendall, D. S. And Gregory, R. P. F., "Purification of phenol oxidases", in *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*, Pridham. J. B. Ed., Pergamon Press, Oxford, (1966), 7.
- [36] Czerkaskij, A., "Pink discoloration in canned Williams Bon Chretien pears", *J. Food Sci.*, 35, (1970), 608.
- [37] Hughes, J. C. And Swain, T., "After-cooking blackening in potatoes. Examination of the interaction of factors by in vitro experiments", *J. Sci. Food Agric.*, 13, (1962), 358.
- [38] Erdüss, T. and Fodor, L., "Removal of phenolic substances from wine", *Kerteszeti Egyetem Kozl.*, 40, (1976), 283.
- [39] Negoro, H., "Effect of polyphenolic compounds on pectinase action", *Eiyo To Shokuryo.*, 25, (1972), 1.
- [40] Burckhardt, R. "Verlust des fruchtigen Wohlgeschmackes bei verarbeiteten Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft, der im Zusammenhang mit der Spaltung von Hydroxyzimtsaurcesteren (Depside) steht", *Disch. Lebensm. Rdsch.*, 74, (1978), 205.
- [41] Herrmann, K., "Phenolische Pflanzeninhaltsstoffe als natürliche Antioxydantein", *Fete. Scifen. Anstrichm.*, 75, (1973), 499.
- [42] Şakiroğlu, H., Kuşburnu Meyvasından İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi Atatürk Üniv., Fen Bilimleri Ens., Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994).
- [43] Sato, M., "The conversion by phenolase of p-coumaric acid to caffeic acid with special reference to the role of ascorbic acid", *Phytochemistry*, 8, (1962), 353.
- [44] Sondheimer. E., "Chlorogenic acids and related depsides", *Bot. Rev.*, 30, (1964), 667.
- [45] Stelzig, D. A., Akhtar, S. and Riberio, S., "Catechol oxidase of Red Delicious apple peel", *Phytochemistry*, 11, (1972), 535.
- [46] Gross. D. and Coombs. J., Enzymatic colour formation in beet and cane juices. Paper presented at the 15th General Assembly of C. I. T. S., (1975), Vienna.

- [47] Jen, J. J., and Kahler K. R., "Characterization of polyphenoloxidase in peaches grown in the Southcast", *Hort Science*, 9, (1974), 590.
- [48] Herrmann, K., "Flavonols and flavones in food plants: a review", *J. Food Technol.*, 11, (1976), 433.
- [49] Espin, J.C., Garcia, P, G., Varon, J.R., and Canovas, F.G., "Monophenolase and diphenolase reaction mechanism of apple and pear polyphenol oxidases", *J. Agric. Food Chem.*, 46, (1988), 2968.
- [50] Espin, J.C., Garcia, P, G., Tudela, J., and Canovas, F.G., "Study of Stereospecificity in pear and strawberry polyphenol oxidases", *J. Agric. Food Chem.*, 46, (1988), 2469.
- [51] Wildanger, W. and Herrmann, K., "Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. H. Die Flavonole des Obstes", *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 151, (1973), 103.
- [52] Herrmann, K., "Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. I. Bisherige Kenntnisse über Vorkommen. Gehalte sowie Veränderungen während des Fruchtwachstums", *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 151, (1973), 41.
- [53] Hanefeld, M. and Herrmann. K., "Über das Vorkommen von Proanthocyanidinen, Leukoanthocyaniden and Catechinen in Gemüse", *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 161, (1976), 243.
- [54] Herrmann, K., "Über das Nichtvorkommen der in höheren Pflanzen verbreiteten phenolischen Inhaltsstoffe im Champignon", *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 155, (1974), 295.
- [55] Herrmann, K., "Über Verfärbungen des Gemüses durch phenolische Inhaltsstoffe", *Disch. Lebensm. Rdsch.*, 72, (1976), 90.
- [56] Matheis, G. and Belitz. H. D., "Untersuchungen zur enzymatischen Bräunung bei Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) I. Phenoloxidasen und phenolische Inhaltsstoffe verschiedener Sorten" *Z. Lebens. Unters. Forsch.*, 163, (1997), 92.
- [57] Martin, W. and Ruberte. R., "The polyphenol of *Dioscorea alata* (yam) tubers associated with oxidative browning", *J. Agric. Food. Chem.*, 24, (1976), 67.
- [58] Lavollay, J., Legrand. G. Lehongre G., and Neumann, J. "Enzyme-substrate specificity in potato polyphenol oxidase", in *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*, Pridham. J. E. Ed. Pergamon Press., Oxford, (1963), 33.

- [59] Vamos-Vigvazo, L. and Gejzago. L. "Substrate specificity of the enzymatic browning of apples", *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.*, 7, (1978), 79.
- [60] Lerch, K., *Metal Ions in Biological Systems*, Sigel, H., Ed; Marcel Dekker, New York, 13, (1981), 143.
- [61] Makino, N., Mason, H.S., "Reactivity of oxytyrosinase toward substrates", *J. Biol. Chem.*, 248, (1973), 5731.
- [62] Makino, N., McMahill, P., and Mason, H.S., "The oxidation state of copper in resting tyrosinase", *J. Biol. Chem.*, 249, (1974), 6062.
- [63] Jolley, R. L., Evans, L.H., and Mason, H.S., "Reversible oxygenation of tyrosinase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46, (1974), 878.
- [64] Jolley, R. L., Evans, L.H., Makino, N., and Mason, H.S., *J. Biol. Chem.*, 249, (1974), 335.
- [65] Wilcox, D.E., Porras, A. G., Hwang, Y.T., Lerch, K., Winkler, M.E., and Solomon, E.I., "Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase", *J. Am. Chem. Soc.*, 107, (1985), 4015.
- [66] Solomon, E. I., and Lowery, M.D., "Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry", *Science*, 259, (1996), 1575.
- [67] Solomon, E.I., Sundaram, U. M., Machonkin, T.E., "Multi copper-per oxidaes and oxygenases", *Chem. Rev.*, 96, (1996), 2563.
- [68] Espin, C. E., Garcia-Ruiz, P.A., Varon R., and Garcia-Canovas, F., "Monophenolase and Diphenolase Reaction Mechanism of Apple and Pear Oxidases", *J. Agric. Food Chem.*, 46, (1998), 2968.
- [69] Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavek, J., and Tumer, N., "Control of Enzymatic Browning in Potato (*Solanum tuberosum* L.) by Sense and Antisense RNA from Tomato Polyphenoloxidase", *J. Agric. Food Chem.* 49, (2001), 652.
- [70] Kahn, V., "Latency properties of polyphenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning", *J. Food Agric.*, 28, (1977), 233.
- [71] Lerner, H.R., Mayer. A.H., and Harel. E., "Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase", *Phytochemistry*, 11, (1972), 2415.

- [72] Ishiguro, R., and Aoyama. Y., Studies on the relationship between L-ascorbic acid and o-diphenol oxidase activity in Radish (*Raphanus sativus* L.) *Eiyo To Shakuryo*. 23, (1970), 13.
- [73] Weaver, M.L., Bron. R. C., and Steen. H. A., "The association of copper with tyrosinase activity and internal discoloration (blackspot) in Russet Burbank potatoes.", *Am. Potato J.*, 45, (1968), 132.
- [74] Schaller, K., "Zur Bestimmung der Polyphenoloxidaseaktivität in Kartoffelknollen", *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 150, (1972), 211.
- [75] Arnaud, Y., "Etude par ultracentrifugation analytique d'un système enzymatique monomère-polymère (polyphénoloxylase)", *J. Polym. Sci. Part C.*, 167, (1965), 4103.
- [76] Pallidina, T. A. and Pervova. Yu. A., "Effect of germination stimulators on potato shoots and tubers", *Fiziol. Rast.*, 13, (1966), 238.
- [77] Palmer, J. K. and Roberts. J. B., "Inhibition of banana polyphenoloxidase by 2-mercaptobenzthiazole", *Science*, 157, (1967), 200.
- [78] Walker, J. R. L., "Enzymatic browning in food. A review", *Enzyme Technol. Dig.*, 4(3), (1975), 89.
- [79] Galeazzi, M. A. and Sgarbieri, V. C., "Banana polyphenoloxidase. Varietal differences and partial characterization in *Sth Int. Congr.*", *Food Sci. Technol.*, Kyoto, Japan, (1978), 237.
- [80] Vaughan, P. F. T. and Butt., V. S. "The action of o-dihydric phenols in the hydroxylation of p-coumaric acid by a phenolase from leaves of spinach beet (*Beta vulgaris* L.)", *Biochem. J.*, 119, (1970), 89.
- [81] Kahn, V., "Latency properties of polyphenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning", *J. Food Agric.*, 28, (1977), 233.
- [82] Weser, U., "Hemmung der o-Diphenol-Oxydase-Aktivität durch Borat und Germanat", *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 349, (1968), 982.
- [83] Pifferi, P. G., Baldassari. L., and Cultrera. R., "Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits", *J. Sci. Food Agric.*, 25, (1974), 263.

- [84] Walker, J. R. L. and Wilson . E. L., "Studies on the enzymatic browning of apples. Inhibition of apple o-diphenol oxidase by phenolic acids", *J. Sci. Food Agric.*, 26, (1975), 1825.
- [85] Walker, J. R. I., "The control of enzymatic browning in fruit juices by cinnamic acid", *J. Food Technol.*, 11,(1976), 341.
- [86] Walker, J. R. L., "Inhibition of the apple phenolase system through infection by *Penicillium expansum*", *Phytochemistry*, 8, (1969), 561.
- [87] Duckworth, H. W. and Coleman. J. E, "Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase", *J. Biol. Chem.*, 245, (1970), 1613.
- [88] Pruidse, G. N. and Grigorashvdi. G. Z., "Extraction and some properties of the o-diphenoloxidase and peroxidase inhibitor from the tea plant", *Prik. Biokhim. Mikrobiol.*, 13, (1977), 104.
- [89] Jones, J. D., Hulme. A. C., and Wooltorton. L. S. C., "Use of poly(vinyl) pyrrolidinone in the isolation of enzymes from chloroplasts", *Phytochemistry.*, 4,(1965), 659.
- [90] Takeo, T., Tea leaf polyphenol oxidase. V. "Effect of antibiotics on the enzyme formation", *Agric. Biol. Chem.*, 30, (1966), 1211.
- [91] Murr, D. P. and Morris, L. L., "Effect of succinic acid-2,2-dimethyl-hydrazide on mushroom o-diphenol oxidase", *J. Chem. Sci. Hortic Sci.*, 99, (1974), 3.
- [92] Warmbier, H. C., Fennema. O., and Marth. E. H., "Inhibition of o-diphenol oxidase by dichlorodifluoromethane", *J. Food Sci.*, 37, (1972), 702.
- [93] Tomova, N., Sechenska, M., and Dechev. G., "Phenoloxidase activity in spinach chloroplasts", *C. R. Acad. Bulg. Sci.*, 19, (1996), 653.
- [94] Abukharma, B. A. and Woolhouse. H. W., "The preparation and properties of o-diphenol:oxygen oxidoreductase from potato tubers", *New Phytol.*, 65, (1966), 477.
- [95] Cash, J. N. Sistrunk, W. A. and Stutte, C. A. "Characteristics of concord grape polyphenol oxidase involved in juice color loss", *J. Food Sci.*, 41, (1976), 1398.
- [96] Nakamura, T., Sho, S., and Ogura. Y., "The purification and properties of mushroom tyrosinase", *J. Biochem.* , 59, (1966), 481.

- [97] Chaves, A. R., and Tomas, J. O., "Efectos del dióxido de carbono sobre la actividad de la polifenoloxidasas de manzanas Red Delicious", *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 16, (1976), 114.
- [98] Kader, A. A., Brecht, P. E., Woodruff, R., and Morris, L. L., "Influence of carbon monoxide, carbon dioxide, and oxygen levels on brown stain, respiration rate and visual quality of lettuce", *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 98, (1973), 485.
- [99] Harel, E., Mayer, M., and Shain, Y., "Catechol oxidases, endogenous substrates and browning in developing apples", *J. Sci. Food Agric.*, 17, (1996), 389.
- [100] Luhadiya, A. P. and Kulkarni, P. R., "Polyphenol oxidase of *Cephaelis frutescens* var. *grossa sendt*", *J. Food Sci. Technol.*, 15, (1978), 214.
- [101] Sojo, M.M., Nunez-Delgado, E., Garcia-Carmona, F., and Sanchez-Ferrer, A. "Cyclodextrins as Activator and Inhibitor of Latent Banana Pulp Polyphenol Oxidase", *J. Agric. Food Chem.*, 47, (1999), 518.
- [102] Mayer, A. M., Harel, E., and Shain, Y., "2,3-Naphthalenediol, a specific competitive inhibitor of phenolase", *Phytochemistry*, 3, (1964), 447.
- [103] Dimpfl, D. and Somogyi, J. C., "Enzymatische Bräunung und ihre Hemmung durch verschiedene Substanzen", *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.*, 66, (1975), 183.
- [104] Weemaes, C.A., Cordt, S.V., Ludikhuyse, L.R., Broeck, I.V., Hendrickx, M.E., and Tobback, P.P., "Influence of pH, Benzoic Acid, EDTA, and Glutathione on the Pressure and/or Temperature Inactivation Kinetics of Mushroom Polyphenoloxidase", *Biotechnol. Prog.*, 13, (1997), 25.
- [105] Eid, K. and Holfelder, E., "Über das Verhalten geschälter Tafeläpfel während kurzfristiger Lagerung bei Verwendung von L-Ascorbinsäure", *Erwerbsobstbau.*, 15, (1973), 55.
- [106] Ponting, J. D. and Jackson, R., "Pre-freezing processing of Golden Delicious apple slices", *J. Food Sci.*, 37, (1972), 812.
- [107] Gajzogo, L., Vamos-Vigyazo, L. and Sümegehy-Kerecsi, N., "Influence of polyphenol oxidase inhibitors on the enzymic browning of apples" in Proc. 18th Hung. Annu. Meet. Biochem. (1978), 201.

- [108] Markasis, P., and Embs, R. J., "Effect of sulfite and ascorbic acid on mushroom polyphenol oxidase", *J. Food Sci.*, 31, (1996), 807.
- [109] Haisman, D. R., "The effect of sulphur dioxide on oxidising enzyme systems in plant tissues", *J. Sci. Food. Agric.*, 28, (1974), 803.
- [110] Muneta, P. and Hsi W., "Influence of pH and bisulfite on the enzymatic blackening reaction in potatoes", *Am. Potato J.*, 54, (1977), 73.
- [111] Mihalyi, K., Vamos-Vigyazo. L. Kiss-Kutz. N., and Babos-Szcbenyl. E. "The activities of polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables as related to pH and temperature", *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.*, 7, (1978), 57.
- [112] Kahn. V., "Latency properties of polyphenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning", *J. Food Agric.*, 28, (1977), 233.
- [113] Flurkey, F. H. and Jen. J. J., "Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches", *J. Food Sci.*, 43, (1978), 1826.
- [114] Loomis, W. D., "Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzymes", *Methods Enzymol.*, 13, (1968), 555.
- [115] Smith, L. L. and Kruger. R. C., "Separation and purification of the phenolases of the common mushroom", *J. Biol. Chem.*, 237, (1962), 1121.
- [116] Rivas, N. J. and Whitaker J. R., "Purification and some properties of two polyphenol oxidases from Bartlett pears", *Plant physiol.*, 52, (1973), 501.
- [117] Lerman, L.S., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 39, (1953), 232.
- [118] Gutteridge, S. and Robb, D. A., *Biochem. Soc. Trans.*, 1, (1973), 519.
- [119] O'Neill, S. P., Greaves, D. J. and Ferguson, J. J., *J. Macromol. Sci. Chem.*, A7, (1973), 1159.
- [120] Yonekura, M., Shimoda, T., and Funatsu, M., *Agric. Biol. Chem.*, 45, (1981), 101.
- [121] Menon, I. A. and Haberman, H. F., *Acta Dermat.*, 55, (1975), 343.
- [122] Flurkey, W. H. and Jen, J. J., *J. Food Biochem.*, 4, (1980), 29.

- [123] Wissemann, K. W. and Lee, C. Y., *J. Chromatogr.*, 192, (1980), 232.
- [124] Wissemann, K. W. and Montgomery, M. W., *Plant Physiol.*, 78, (1985), 256.
- [125] Golan-Goldhirsh, A. and Whitaker, J. R., In *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety* (Friedman, M., ed.), 177, (1984), pp. 437-456. Plenum Press, New York.
- [126] Kahn, V. And Andrawis, A., *Phytochemistry*, 24, (1985), 905.
- [127] J. Ingebrigtsen and W. H. Flurkey., *Phytochemistry*, 27(6), (1998), 1593.
- [128] Pathak, S. U., Karyekar, S. K., Ghole, V. S., and Hegde, M. V., "Effect of Activation Methods on Affinity Chromatography of Potato Polyphenol Oxidase", *Phytochemistry*, 31(5), (1992), pp. 1481.
- [129] Mayer, A. M., Harel, E., and Ben-Shaul, R., "Assay of catechol oxidase-a critical comparison of methods", *Phytochemistry*, 5, (1966), 783.
- [130] Mihalyi, K. and Vamos-Vigyazo, L. "A method for determining polyphenol oxidase activity in fruits and vegetables applying a natural substrate", *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.*, 5, (1976), 69.
- [131] Heimann, W. and Andler, St., "Zur Aktivitätsbestimmung der Polyphenoloxidase. III. Eine polarometrische Methode zur Bestimmung der Phenolaseaktivität", *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 117, (1962), 203.
- [132] Garrett, B. C., "Reinvestigation of phenol oxidase activity by improved analytical techniques", *Diss. Abstr.*, 36(7), (1976), 3340-B.
- [133] Mazzocco, F. and Pifferi, P. G., "An improvement of the spectrophotometric method for the determination of tyrosinase catecholase activity by Besthorn's hydrazone" *Anal. Biochem.*, 72, (1976), 643.
- [134] Esterbauer, H., Schwarzl, E., and Hayn, M., "A rapid assay for catechol oxidase and laccase using 2-nitro-5-thiobenzoic acid", *Anal. Biochem.*, 77, (1977), 486.
- [135] Mondy, N. Land Koch, R. L., "Effect of potato virus X on enzymatic darkening and lipid content of potatoes", *J. Food Sci.*, 43, (1978), 703.
- [136] Weber, D.J. and Stahmann, M. A., "Ceratocystis infection in sweet potato; its

- effect on proteins, isozymes and acquired immunity”, *Science.*, 146, (1964), 929.
- [137] Bugber, M., “Peroxidase, polyphenol oxidase and endopolygalacturonate trans-eliminase activity in different tissues of sugar beet infected with *phoma betae*”, *Can. J. Bot.*, 53, (1975), 1347.
- [138] Walker, J. R. L., “Phenolase inhibitor from cultures of *Penicillium expansum* which may play a part in fruit rotting”, *Nature*, 227, (1970), 298.
- [139] Ndubizu, T. O. C., “Relations of phenolic inhibitors to resistance of immature apple fruits to rot”, *J. Hortic. Sci.*, 51, (1976), 311.
- [140] Molchanova, Z. Ya., “The role of oxidases in the resistance of grapevines to unfavorable conditions of Wintering”, *Vinodel. Vinograd.*, 26(1), (1966), 21.
- [141] Szabo, M. T., “Effect of polyphenols on digestion of proteins”, *Proc. 19th Hung. Annu. Meet. Biochem.*, (1999), 223.
- [142] Cuatrecasas, P., “Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads”, *J. Biol. Chem.*, 245, (1970), 3059.
- [143] Laemmli, D. K., “Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄”, *Nature*, (1970), London, 227.
- [144] Jaenicke, L., *Protein Bestimmung, Einführung in the Praxis des Biochemikers*, 1984, Köln, p27.
- [145] Bradford, M. M., “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, 72, (1976), 248.
- [146] Keha, E. E., *Karbonik anhidraz enziminin saflaştırılması için geliştirilmiş bir afinite kromotografisi metodu. Doçentlik Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Erzurum*, (1981).
- [147] Wistrand, P. J., Lindahl, S. and Wahlstrand, T., “Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties”, *Eur J. Biochem.*, 57, (1975), 189.
- [148] Jakoby, B. and Wilchek, M., “Coupling reaction of Ligands and general methodology of affinity chromatography” in *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, (1974).

- [149] Arslan, O., Glaucoma Hastalığı Tedavisinde Kullanılmaya Aday Karbonik Anhidraz İnhibitörlerinin Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, (1994).
- [150] Flurkey, H. W., "Janis I., Affinity Chromatography of Mushroom Tyrosinase", *Phytochemistry*, 27(6), (1988), 1593.
- [151] Suniti U. Pathak and Vikram S. Ghole., "Affinit Purification and properties of polyphenoloxidase from Solanum Tuberosum", *Phytochemistry*, 36(5), (1994), 1165.
- [152] Halder, J., Tamuli, P., Bhaduri, A.N., "Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase from Indian Tea Leaf", *J.Nutr. Biochem.*, 9, (1998), 75.
- [153] Raymond, J., Rakariyathan, N., and Azanza, J.L., "Purification and some Properties of Polyphenol Oxidases From Sunflower Seeds", *Phytochemistry*, 34, (1993), 927.
- [154] Murata, M., Kurokami, C., Homma, S., and Matsushashi, C., "Immunochemical and Immunohistochemical Study of Apple Chlorogenic Acid Oxidase", *J.Agric. Food Chem.*, 41, (1993), 1385.
- [155] Galeazzi, M.A.M., Sgarbieri, V.C., and Constantinides, S.M., "Purification and Physicochemical Characterization of Polyphenol Oxidase from a Dwarf Variety of Banana", *J. Food Sci.*, 46, (1981), 150.
- [156] Fujita, S., Saari, N.B., Maegawa, M., Tetsuka, T., Hayashi, N., and Tono, T., "Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from Cabbage", *J.Agric. Food Chem.*, 43, (1995), 1138.
- [157] Nagai, T., and Suzuki, N., "Partial Purification of Polyphenol Oxidase from Chinese Cabbage", *J.Agric. Food Chem.*, 49, (2001), 3922.
- [158] Jharna, R.D., Santhoor, G.B., and Lalitha, R.G., "Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from the Kew Cultivar of Indian Pineapple Fruit", *J.Agric. Food Chem.*, 45, (1997), 2031.
- [159] Fujita, S., Tono, T., and Kawahara, H., "Purification and Properties of Polyphenol Oxidase in Head Lettuce", *J. Sci. Food Agric.* 55, (1991), 643.
- [160] Euclides, J.L., Souza, L.J., and Valdir, A.N., "Heat Inactivation and Kinetics of Polyphenol Oxidase from Palmito", *J. Sci. Food Agric.* 52, (1990), 249.

- [161] Murao, S., Oyamo, H., Namura, Y., Tono, T., and Shin, T., "Purification and Characterization of Edible Burdock Polyphenol Oxidase", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(2), (1993), 177.
- [162] Lee, P.M., Lee K.H., and Karim, M.İ.A., "Biochemical Studies of Cocoa Bean Polyphenol Oxidase", *J. Sci. Food Agric.* 55, (1991), 251.
- [163] Ferdinand, C.C., Emmanuel, O.A., and Patrick, C.E., "Purification and Properties of Polyphenol Oxidase from Oil Bean Seeds", *J. Sci. Food Agric.* 61, (1993), 125.
- [164] Beena, P., and Gowda, L.R., "Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from the Seeds of Field Bean", *J. Agric. Food.Chem.*, 48, (2000), 3839.
- [165] Doğan, M., Arslan, O., and doğan, S., "Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from different *aubergine cultivars*", *International journal of Food Science and Technology*, 37, (2002), 415.
- [166] Lerch, K., Invertebra Oxygen Binding Proteins. Proceedings Workshop, Ed., Lory J., and J. Dekker, New York, (1981), 259.
- [167] Oktay, M., Küfrevioğlu, İ., Kocaçalışkan, İ., and Şakiroğlu, H., "Polyphenol Oxidase From Amasya Apple", *Journal of Food Science*, 60, (1995), 1.
- [168] Zhou, H., and Feng, X., "Polyphenol Oxidase From Yali Pear", *J. Sci. Food Agric.* 57, (1991), 307.
- [169] Onsa, G.H., Saari, N.B., Selamet, J., and Bakar, J., "Latent Polyphenol Oxidase from Sago Log: Partial Purification, Activation, and Some Properties", *J. Agric. Food.Chem.*, 48, (2000), 5041.
- [170] Gauillard, F., Richard, F.F., "Polyphenol Oxidase from Williams Pear: Activation, Purification and Some Properties", *J. Sci. Food Agric.* 74, (1997), 49.
- [171] Gonzales, E.M., Ancos, B., and Cano M.P, "Partial Characterization of Peroksaidaz and Polyphenol Oxidase in Blacberry Fruits ", *J. Agric. Food Chem.*, 48, (1998), 5459.
- [172] Arslan, O., Temur, A., and Tozlu, İ., "Polifenol Oxidase From Malatya Apricot (*Prunus armeniaca* L.)", *J. Agric. And Food Chemistry*, 45, (1998), 2861.

- [173] Gonzales, E.M., Ancos, B., and Cano, M. P., "Partial Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Raspberry Fruits", *J. Agric. and Food Chemistry*, 47, (1999), 4068.



TC YIKSÖĞÜTLÜK KÜTÜPHANESİ
BOĞAZİÇİ MÜHÜRÜ